

**GISELE QUEIROZ CARVALHO**

**ESTUDO DE ALGUNS MARCADORES INFLAMATÓRIOS E DE  
SÍNDROME METABÓLICA EM ADOLESCENTES COM  
SOBREPESO E NAQUELAS METABOLICAMENTE OBESAS  
DE PESO NORMAL.**

Dissertação apresentada à  
Universidade Federal de Viçosa, como  
parte das exigências do Programa de  
Pós-Graduação em Ciência da Nutrição,  
para obtenção do título de *Magister  
Scientiae*.

**VIÇOSA  
MINAS GERAIS - BRASIL  
2008**

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e  
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

C331e  
2008

Carvalho, Gisele Queiroz, 1984

Estudo de alguns marcadores inflamatórios e de síndrome metabólica em adolescentes com sobrepeso e naquelas metabolicamente obesas de peso normal / Gisele Queiroz Carvalho – Viçosa, MG, 2008.  
xv, 99f.: il. (algumas col.) ; 29cm.

Inclui anexos.

Orientador: Maria do Carmo Gouveia Peluzio

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Síndrome metabólica. 2. Obesidade em adolescentes.  
3. Distúrbios do metabolismo. 4. Composição corporal.  
5. Adolescente. 6. Resistência à insulina.  
I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.

CDD 22.ed. 616.398

**GISELE QUEIROZ CARVALHO**

**ESTUDO DE ALGUNS MARCADORES INFLAMATÓRIOS E DE  
SÍNDROME METABÓLICA EM ADOLESCENTES COM  
SOBREPESO E NAQUELAS METABOLICAMENTE OBESAS  
DE PESO NORMAL.**

Dissertação apresentada à  
Universidade Federal de Viçosa, como  
parte das exigências do Programa de  
Pós-Graduação em Ciência da Nutrição,  
para obtenção do título de *Magister  
Scientiae*.

APROVADA: 03 de outubro de 2008

---

Prof<sup>a</sup>. Silvia Eloiza Priore  
(Co-orientadora)

---

Prof. Sérgio Oliveira de Paula  
(Co-orientador)

---

Prof<sup>a</sup>. Jacqueline Isaura Alvarez Leite

---

Prof<sup>a</sup>. Sônia Machado Rocha Ribeiro

---

Prof<sup>a</sup>. Maria do Carmo Gouveia Peluzio  
(orientadora)

*Essa obra é dedicada à minha mãe Marly...  
Símbolo de força e doçura...*

## AGRADECIMENTOS

À Deus... fonte inesgotável de amor!

À minha mãe pelo constante apoio e incentivo ao longo destes anos. Certamente, a maior responsável por mais essa conquista! Não existem palavras que representem de maneira fiel a importância desse anjo em minha vida! Amo você!!!...

À meus irmãos, pelo carinho e apoio! Agradeço pelas palavras de incentivo e pelos conselhos. Minha família.... meu chão!!!... Amo vocês!...

Ao Ângelo, por toda a atenção, carinho e amparo. Em muito contribuiu para o desenvolvimento deste trabalho. Um obrigado especial!

Ao Nissandro... pessoa especial que se fez presente em período bastante conturbado dessa caminhada!! Obrigada pelo apoio psicológico e pela ajuda na elaboração deste trabalho! À você todo o meu carinho!...

À minha querida orientadora Maria do Carmo Peluzio pela confiança, ensinamentos e assistência. Pessoa responsável por fazer deste um período profícuo, de grande aprendizagem e amadurecimento profissional e pessoal. Agradeço por abrandar esse período com todo seu bom humor e carinho. Realmente, uma “mãe”...

Aos meus co-orientadores Silvia Priore, Sérgio de Paula e Sylvia Franceschini pelas proveitosas discussões e por todo auxílio dispensado ao longo deste período.

À Hiara e à Patrícia... grandes amigas. Fomos uma verdadeira equipe, nos ajudando, apoiando e fornecendo alento umas às outras nos momentos mais difíceis! Muito obrigada pela possibilidade de crescimento profissional ao lado de vocês!

À professora Jacqueline Leite, por estar presente em minha formação profissional há algum tempo. Obrigada por abrir as portas de seu laboratório e por toda contribuição no desenvolvimento deste trabalho.

À professora Sônia Machado pela disponibilidade e pelas contribuições dadas à este trabalho.

Às companheiras de “buffy coat” (rs) Júnia Maria e Regiane Lopes, por compartilharem deste novo desafio e por toda ajuda dispensada ao longo deste período. Obrigada pela amizade e por todo apoio!!!...

Às estagiárias Fernanda Drummond e Lorena, as quais foram indispensáveis na coleta dos dados. Obrigada por acordarem às 5:30 da manhã, sempre com grande ânimo, e fazerem com que este trabalho também fosse de vocês.

À minha prima Natália, que muito me auxiliou durante minha estada em Viçosa, sempre prestativa e bondosa! Obrigada!

Às amigas do mestrado Maria Carolina, Ana Carolina, Hudsara, Daniela, Mônica, Poliane Sakon. Cada qual com distintas e importantes contribuições, seja no âmbito pessoal, ou mesmo técnico. Saiba que este trabalho possui um pedacinho de cada uma de vocês!!!....

Aos demais amigos do Programa de Pós-graduação em Ciência da Nutrição da UFV. Obrigada pela amizade!

Aos funcionários e usuários do laboratório de Imunologia e Virologia da UFV, pela agradável convivência e pelos grandes ensinamentos.

Agradecimento especial ao Alípio e à Carol, por toda presteza e ensinamentos compartilhados durante as análises para quantificação do mRNA, realizadas no laboratório de Imunologia e Virologia

Ao Nicola e à Priscila do LabTec (UFV), pela paciência e ajuda no manejo do equipamento de real time RT-PCR. À vocês, gratidão eterna!

Ao Alexandre Novello e demais funcionários do Laboratório de Análises Clínicas da UFV, em especial o Pedro, pelos ensinamentos e pela possibilidade de realização de parte do trabalho nesse local.

Às adolescentes participantes do estudo, sem as quais este trabalho não seria possível.

Às escolas, que nos abriram as portas e possibilitaram a realização da triagem nesse local.

À FAPEMIG, pelo financiamento do projeto.

À todos os professores e funcionários do Departamento de Nutrição e Saúde pela ajuda prestada.

À Universidade Federal de Viçosa, pela oportunidade de aperfeiçoamento profissional.

## **BIOGRAFIA**

**Gisele Queiroz Carvalho**, filha de Marly Queiroz de Assis Carvalho e Guilherme Nascimento de Carvalho, nascida em 14 de maio de 1984, em João Monlevade, Minas Gerais.

Em fevereiro de 2002 iniciou o curso de graduação em nutrição pela Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri (Diamantina - MG), concluindo em dezembro de 2005. Em 2006 iniciou o curso de especialização em Nutrição Humana e Saúde pela Universidade Federal de Lavras (Lavras - MG), concluindo em 2007. O curso de mestrado em Ciência da Nutrição da Universidade Federal de Viçosa (Viçosa – MG) teve início em outubro de 2006, concluindo em outubro de 2008.

## SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	viii
LISTA DE TABELAS E FIGURAS.....	x
RESUMO.....	xii
ABSTRACT.....	xiv
1 INTRODUÇÃO .....	1
2 REVISÃO DE LITERATURA: Inflamação crônica subclínica em adolescentes: papel do tecido adiposo no desenvolvimento de doenças crônicas não- transmissíveis.....	6
Resumo.....	6
Abstract.....	7
2. 1 Doenças crônicas na adolescência.....	8
2.1.1 Caracterização da adolescência.....	8
2.1.2 Obesidade.....	9
2.1.3 Síndrome metabólica.....	11
2. 2 O tecido adiposo como órgão endócrino.....	14
2.2.1 Tecido adiposo e inflamação subclínica.....	14
2.2.2 Inflamação subclínica e resistência insulínica.....	20
2.3 Inflamação subclínica em adolescentes.....	23
2.4 Inflamação subclínica em indivíduos com peso normal e elevada gordura corporal.....	25
2.5 Considerações Finais.....	27
Referências Bibliográficas.....	28
3 OBJETIVOS.....	35
3.1 Geral.....	35
3.2 Específicos.....	35
4 METODOLOGIA.....	36
4.1 Delineamento do estudo.....	36
4.2 Casuística.....	36
4.2.1 Critérios de inclusão.....	36
4.2.2 Critérios de exclusão.....	37
4.3 Materiais e métodos.....	37
4.3.1 Seleção da amostra.....	37
4.3.2 Coleta de dados.....	38
4.3.3 Caracterização da população.....	39
4.3.4 Antropometria.....	39
4.3.5 Composição corporal.....	40
4.3.6 Pressão arterial.....	41

4.3.7 Avaliação bioquímica.....	43
4.3.8 Marcadores de risco para a síndrome metabólica.....	43
4.3.9 Quantificação do mRNA dos marcadores inflamatórios.....	44
4.4 Processamento de dados e análise estatística.....	46
4.5 Aspecto ético.....	46
Referências Bibliográficas.....	47
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	48
5.1 Artigo 1: Expressão periférica de marcadores inflamatórios em adolescentes do gênero feminino com sobrepeso e nas “metabolicamente obesas de peso normal”.....	48
Resumo.....	48
Abstract.....	49
5.1.1 Introdução.....	50
5.1.2 Metodologia.....	51
5.1.2.1 Casuística.....	51
5.1.2.2 Métodos.....	52
5.1.2.3 Análise estatística.....	56
5.1.3 Resultados.....	57
5.1.4 Discussão.....	57
5.1.5 Conclusão.....	61
5.1.6 Tabelas e gráficos.....	62
Referências Bibliográficas.....	67
5.2 Artigo 2: Expressão periférica de TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-10 em adolescentes do gênero feminino com sobrepeso resistentes à insulina.....	70
Resumo.....	70
Abstract.....	71
5.2.1 Introdução.....	72
5.2.2 Metodologia.....	74
5.2.2.1 Casuística.....	74
5.2.2.2 Métodos.....	74
5.2.2.3 Análise estatística.....	78
5.2.3 Resultados.....	79
5.2.4 Discussão.....	79
5.2.5 Conclusão.....	83
5.2.6 Tabelas e gráficos.....	85
Referências Bibliográficas.....	90
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	93
7 ANEXOS.....	95

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>°C</b>	<i>Grau Celsius</i>
<b>CC</b>	<i>Circunferência da cintura</i>
<b>CDC</b>	<i>Center for Disease Control and Prevention</i>
<b>cm</b>	<i>Centímetros</i>
<b>Ct</b>	<i>Cycle threshold</i> (ponto onde um aumento exponencial na quantidade de amplificado (fluorescência) é primeiramente detectado no ciclo da RT-PCR)
<b>DNA</b>	<i>Ácido Desoxirribonucléico</i>
<b>g</b>	Força centrífuga relativa (aceleração da gravidade)
<b>G1</b>	Grupo 1: Adolescentes eutróficas segundo IMC e percentual de gordura corporal
<b>G2</b>	Grupo 2: Adolescentes metabolicamente obesas de peso normal (eutróficas segundo o IMC, porém com gordura corporal elevada).
<b>G3</b>	Grupo 3: Adolescentes com sobrepeso (excesso de peso e gordura corporal)
<b>GLUT4</b>	Transportador de Glicose 4
<b>HDL</b>	Lipoproteína de alta densidade ( <i>High Density Lipoprotein</i> )
<b>HOMA-IR</b>	<i>Homeostasis Model Assessment: Evaluation model of homeostasis of insulin sensibility</i> – Modelo de avaliação da sensibilidade à insulina
<b>kg</b>	<i>Quilogramas</i>
<b>ICAM-1</b>	Intercellular adhesion molecule-1 (Molécula de adesão intercelular-1)
<b>IL-1<math>\alpha</math></b>	Interleucina-1 $\alpha$
<b>IL-1<math>\beta</math></b>	Interleucina-1 $\beta$
<b>IL-6</b>	Interleucina-6
<b>IL-8</b>	Interleucina-8
<b>IL-10</b>	Interleucina-10
<b>IMC</b>	Índice de Massa Corporal
<b>Kg/m<sup>2</sup></b>	Quilogramas por metro quadrado
<b>LPL</b>	Lipase Lipoproteica
<b>m</b>	Metros
<b>MCP-1</b>	<i>Monocyte Chemoattractant Protein-1</i> (Proteína-1 quimiotática para monócitos)
<b>mm</b>	Milímetros
<b>MG</b>	Minas Gerais

<b><i>Mg/dL</i></b>	Miligramas por decilitro
<b><i>mg/L</i></b>	Miligramas por litro
<b><i>mL</i></b>	Mililitros
<b><i>mmHg</i></b>	Milímetro de mercúrio
<b><i>mRNA</i></b>	Ácido ribonucléico mensageiro
<b><i>NCHS</i></b>	<i>National Center for Health Statistics</i>
<b><i>NCEP/ATPIII</i></b>	<i>National Cholesterol Education Program/Adult Treatment Panel III</i>
<b><i>NFκB</i></b>	Fator de transcrição nuclear-κB
<b><i>ng/mL</i></b>	<i>Nanograma por microlitro</i>
<b><i>NHANES</i></b>	<i>National Health and Nutrition Examination Survey</i>
<b><i>NHANES III</i></b>	The Third National Health and Nutrition Survey
<b><i>nM</i></b>	<i>Nanomolar</i>
<b><i>p</i></b>	Nível de significância estatística (Probabilidade)
<b><i>P</i></b>	Percentil
<b><i>PAD</i></b>	Pressão Arterial Diastólica
<b><i>PAS</i></b>	Pressão Arterial Sistólica
<b><i>pb</i></b>	Pares de base
<b><i>PCR</i></b>	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
<b><i>PROASA</i></b>	Programa de Atenção à Saúde do Adolescente
<b><i>Ri</i></b>	Grupo de adolescentes com sobrepeso e resistência insulínica
<b><i>RNA</i></b>	Ácido ribonucléico
<b><i>RT-PCR</i></b>	<i>Real-Time Polymerase Chain Reaction</i>
<b><i>Si</i></b>	Grupo de adolescentes com sobrepeso sem resistência insulínica
<b><i>tA</i></b>	Temperatura de anelamento
<b><i>TG</i></b>	Triglicerídeos
<b><i>tM</i></b>	Temperatura de <i>melting</i>
<b><i>TNF-α</i></b>	Fator de Necrose Tumoral - alfa
<b><i>UFV</i></b>	Universidade Federal de Viçosa
<b><i>VCAM-1</i></b>	Vascular cell adhesion molecule-1 (Molécula de adesão vascular-1)
<b><i>WHO</i></b>	<i>World Health Organization</i>
<b><i>μg/mL</i></b>	<i>Micrograma por microlitro</i>
<b><i>μL</i></b>	<i>Microlitros</i>

## LISTA DE TABELAS E FIGURAS

### METODOLOGIA

Tabela 1 - Parâmetros propostos para diagnóstico clínico da Síndrome Metabólica pelo <i>National Cholesterol Education Program/Adult Treatment Panel III</i> .....	43
--	----

### **ARTIGO 1: Aumento da expressão de marcadores inflamatórios em adolescentes do gênero feminino pós-púberes com excesso de gordura corporal**

Tabela 1: Características antropométricas de adolescentes do gênero feminino, estudantes de escolas públicas de Viçosa-MG.....	62
Tabela 2: Parâmetros relacionados à Síndrome Metabólica, em adolescentes do gênero feminino, estudantes de escolas públicas de Viçosa-MG.....	62
Tabela 3: Expressão das citocinas* (número de vezes em relação ao grupo eutrófico) de adolescentes do gênero feminino, estudantes de escolas públicas de Viçosa-MG.....	63
Gráfico 1: Expressão do TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-10 (em número de vezes) das adolescentes do gênero feminino eutróficas com elevado %GC (G2) e com sobrepeso (G3), em relação ao grupo controle.....	64
Tabela 4: Correlação da expressão de citocinas e dos fatores relacionados à Síndrome Metabólica em adolescentes do gênero feminino com sobrepeso e nas “eutróficas com elevado percentual de gordura corporal”.....	65
Tabela 5: Correlação da expressão de citocinas e dos fatores relacionados à Síndrome Metabólica em adolescentes do gênero feminino “eutróficas com elevado percentual de gordura corporal” .....	65
Tabela 6: Correlação da expressão de citocinas e dos fatores relacionados à Síndrome Metabólica em adolescentes do gênero feminino com sobrepeso.....	66

### **ARTIGO 2: Inflamação subclínica e resistência insulínica: influência do sistema imune no desenvolvimento de distúrbios relacionados com síndrome metabólica em adolescentes do gênero feminino pós-púberes com sobrepeso.**

Tabela 1: Características antropométricas de adolescentes do gênero feminino, estudantes de escolas públicas de Viçosa-MG.....	85
--	----

Tabela 2: Parâmetros relacionados à Síndrome Metabólica, em adolescentes do gênero feminino, estudantes de escolas públicas de Viçosa-MG.....	<b>85</b>
Tabela 3: Expressão das citocinas* (número de vezes em relação ao grupo eutrófico) de adolescentes do gênero feminino com sobrepeso e resistência insulínica (Ri) e naquelas com sobrepeso sem resistência insulínica (Si), estudantes de escolas públicas de Viçosa-MG.....	<b>86</b>
Gráfico 1: Expressão do TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-10 (em número de vezes) das adolescentes do gênero feminino eutróficas com elevado %GC (G2) e com sobrepeso (G3), em relação ao grupo controle.....	<b>87</b>
Tabela 4: Correlação da expressão de citocinas e dos fatores relacionados à Síndrome Metabólica em adolescentes do gênero feminino com sobrepeso (n = 20).....	<b>88</b>
Tabela 5: Correlação da expressão de citocinas e dos fatores relacionados à Síndrome Metabólica em adolescentes do gênero feminino com sobrepeso e sensíveis à insulina (n = 10).....	<b>88</b>
Tabela 6: Correlação da expressão de citocinas e dos fatores relacionados à Síndrome Metabólica em adolescentes do gênero feminino com sobrepeso e resistentes à insulina (n = 10).....	<b>89</b>

## RESUMO

CARVALHO, Gisele Queiroz, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, outubro de 2008. **Estudo de alguns marcadores inflamatórios e de síndrome metabólica em adolescentes com sobrepeso e naquelas metabolicamente obesas de peso normal.** Orientadora: Maria do Carmo Gouveia Peluzio. Co-orientadores: Sylvia do Carmo Castro Franceschini, Sérgio Oliveira de Paula e Silvia Eloiza Priore.

A inflamação crônica subclínica se configura como nova síndrome relacionada com o desenvolvimento da resistência insulínica. O tecido adiposo aparece como importante órgão responsável pelo aumento da expressão de substâncias inflamatórias, contribuindo para o desenvolvimento desta síndrome. Pouco se sabe sobre essa condição em adolescentes com excesso de gordura corporal. O objetivo deste estudo foi avaliar o perfil inflamatório de adolescentes do gênero feminino pós-púberes com sobrepeso e nas “metabolicamente obesas de peso normal”, e de adolescentes com sobrepeso resistentes à insulina. Também foi intuito verificar a relação entre a expressão periférica dos mediadores TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-10 e os parâmetros relacionados com a síndrome metabólica. Foram avaliadas 72 adolescentes do gênero feminino pós-púberes, de 14 a 17 anos de idade, divididas em 3 grupos: eutróficas (G1), “metabolicamente obesas de peso normal” (G2) e sobrepeso (G3). Coletaram-se dados relacionados aos parâmetros da síndrome metabólica: circunferência da cintura, glicemia de jejum, insulinemia de jejum, resistência insulínica, triglicerídeos, HDL, pressão arterial sistólica e diastólica. Após a aferição dos parâmetros bioquímicos, do grupo de adolescentes com sobrepeso foram selecionadas 10 adolescentes sem resistência insulínica, as quais constituíram o grupo controle (Si), e 10 adolescentes com resistência insulínica (Ri). Avaliou-se a expressão dos mediadores TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-10 nos grupos de estudo, e a correlação desses mediadores com os parâmetros da síndrome metabólica. Foi possível constatar que G2 apresentou valores intermediários de peso, IMC e %GC em comparação com G1 e G3. Maiores valores de glicemia e de resistência insulínica foram verificados no G2 em relação ao G1, não diferindo do G3. G2 apresentou maiores valores de insulinemia e menores de HDL que G3. Avaliando-se a expressão periférica das citocinas do G2 e G3 em relação ao G1, G3 apresentou aumento na expressão de TNF- $\alpha$  e IL-10 de 6% e 31%, respectivamente, e o G2 apresentou aumento de 44% na expressão de IL-6, não havendo diferenças na expressão das citocinas entre G2 e G3. Verificou-se correlação positiva entre TNF- $\alpha$  e IL-6, e entre IL-10 e as citocinas

pró-inflamatórias nas adolescentes do G2, e nas adolescentes com excesso de gordura corporal (G2 + G3), e correlação positiva entre a IL-6 e glicemia (grupo G2), e entre IL-6 e triglicerídeos (grupo G3). Em relação às adolescentes com sobrepeso, não houve diferença na expressão das citocinas avaliadas entre os grupos Si e Ri, embora a expressão periférica de IL-10 no grupo Ri tenha apresentado-se 370% maior, em relação ao grupo Si. Nas adolescentes do grupo Si, IL-6 correlacionou-se positivamente com IL-10, e negativamente com a insulinemia. IL-10 correlacionou-se negativamente com glicemia de jejum no grupo Si. No grupo Ri, não houve correlação entre a expressão de citocinas e os parâmetros relacionados com a síndrome metabólica. No presente estudo, adolescentes “metabolicamente obesas de peso normal” apresentaram perfil metabólico, inflamatório e de composição corporal semelhante à de adolescentes com sobrepeso. Demonstrou-se possível relação entre IL-6 e glicemia e triglicerídeos. A correlação positiva entre IL-10 e TNF- $\alpha$  e IL-6, bem como a maior expressão de IL-10 nas adolescentes com sobrepeso em relação às eutróficas, sugere tentativa de inibição da produção dessas citocinas pela IL-10. Nas adolescentes com sobrepeso, aquelas resistentes à insulina apresentaram expressão periférica dos marcadores inflamatórios semelhante às aquelas com excesso de peso sem resistência insulínica. O aumento da IL-10, e sua correlação negativa com a glicemia de jejum, indica possível papel protetor desta citocina no desenvolvimento de fatores de risco cardiovasculares.

## ABSTRACT

CARVALHO, Gisele Queiroz, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, October 2008. **Study of some inflammatory markers and metabolic syndrome in overweight adolescents and in those metabolic obese normal weight.** Adviser: Maria do Carmo Gouveia Peluzio. Co-advisers: Sylvia do Carmo Castro Franceschini, Sérgio Oliveira de Paula and Silvia Eloiza Priore.

The subclinical chronic inflammation is confirmed as a new syndrome related to the development of insulin resistance. The fat tissue appears as important organ responsible for the increased expression of inflammatory substances, contributing to the development of this syndrome. This condition in adolescents with excess body fat is little known. The aim of this study was to evaluate the inflammatory profile of adolescents in overweight female post-pubescent, in those “metabolic obese normal weight” adolescents resistant to insulin. It was also a goal to verify the relationship between peripheral expression of mediators TNF-alpha, IL-6 and IL-10 and the parameters related to metabolic syndrome. 72 female adolescents in post-pubescent were evaluated, 14 to 17 years old. They were divided into 3 groups: eutrophic (G1), “metabolic obese normal weight” (G2) and overweight (G3). Data related to the parameters of the metabolic syndrome were collected: waist circumference, fasting plasma glucose, fasting insulin, insulin resistance, triglycerides, HDL, systolic and diastolic blood pressure. After the measurement of biochemical parameters, 10 overweight adolescents which were not insulin resistant were selected and those formed the control group (Si), and 10 overweight adolescents with insulin resistance were also chosen (Ri). It was evaluated the expression of mediators TNF-alpha, IL-6 and IL-10 in groups of study, and the correlation of these cytokines with the parameters of the metabolic syndrome. It was observed that G2 had intermediary values of weight, IMC and %GC in comparison to G1 and G3. Glicemia and insulin resistance were increased in G2 in comparison to G1, not differing of the G3. Insulinemia was increased and HDL was decreased in G2 in comparison to G3. Evaluating the peripheral expression of citocinas of G2 and G3 in comparison to G1, G3 had increase of 6% and 31% in expression of TNF- $\alpha$  and IL-10, respectively, and G2 had increase of 44% in expression of IL-6, without differences in the expression of cytokines between G2 and G3. There was positive correlation between TNF- $\alpha$  and IL-6, and between IL-10 and pro-inflammatory cytokines in the adolescents of G2, and in the adolescents with excess of body fat (G2 + G3), and positive correlation between IL-6 and glicemia (G2 group), and between IL-6 and triglycerides (G3

group). Considering overweight adolescents, there was no difference in the expression of cytokines evaluated among Si and Ri groups, although peripheric expression of IL-10 in the Ri group was 370% larger, regarding the Si group. In the adolescents of the Si group, IL-6 was positively correlated with IL-10, and negatively with insulinemia. IL-10 was negatively correlated with fast glicemia in the Si group. In the Ri group, there was no correlation between expression of cytokines and the parameters related with the metabolic syndrome. In the present study, “Metabolic obese normal weight” adolescents had metabolic profile, inflammatory profile and body composition similar to adolescents with overweight. It demonstrated the possible relation between IL-6 and glicemia and triglycerides. The positive correlations between IL-10 and TNF- $\alpha$ , IL-10 and IL-6, as well as the increased expression of IL-10 in overweigh adolescents regarding the eutrophic, suggests an attempt to inhibition the production of these citocinas by IL-10. Overweight adolescents with insulin resistance had similar peripehric expression to those overweight adolescents without insulin resistance. The increase of IL-10, and their negative correlation with fast glicêmica, can indicate possible protective paper of this cytokine in the development of cardiovascular risk factors.

## 1 INTRODUÇÃO

Com a transição nutricional, um novo perfil epidemiológico tem preocupado especialistas e autoridades em saúde pública. A diminuição dos casos de desnutrição e o aumento dos casos de sobrepeso/obesidade e de suas co-morbidades são evidentes em todo o mundo, e o Brasil tem acompanhado essas tendências (Diretrizes Brasileiras de Obesidade, 2007).

A adolescência caracteriza-se pela baixa prevalência de doenças infecto-parasitárias, entretanto, as doenças crônicas não-transmissíveis têm se destacado como importantes distúrbios que acometem esta população (Albano e Souza, 2001). O aumento da prevalência de obesidade na adolescência, principalmente no gênero feminino, tem preocupado os especialistas, uma vez que é grande a probabilidade de um adolescente obeso tornar-se um adulto obeso e/ou apresentar aumento da prevalência de diabetes *mellitus*, dislipidemias, hipertensão arterial e resistência insulínica na vida adulta (Daniels et al., 2005).

Esta mudança no perfil nutricional é acompanhada da diminuição da prática de atividade física de lazer e mudanças no padrão alimentar da população. Em adolescentes, além da baixa prática de atividade física, o consumo de alimentos ricos em gorduras saturadas, sal e açúcar, e o baixo consumo de frutas e hortaliças, contribuem para o aumento da obesidade e de suas co-morbidades nesta população (Garcia et al., 2003; Oehlschlaeger et al., 2004).

É sabido que, tanto a obesidade quanto suas co-morbidades, estão associadas com o aumento da morbidade e da mortalidade por doenças cardiovasculares. Estas estão entre as maiores causas de mortalidade nos dias atuais em países desenvolvidos ou naqueles em desenvolvimento, gerando enormes gastos em saúde pública (Santos et al., 2006).

A síndrome metabólica é um distúrbio complexo caracterizado por alterações metabólicas, dentre as quais alterações no metabolismo glicídico, presença de dislipidemias, obesidade, hipertensão arterial, estados pró-trombótico e pró-inflamatório. Sua prevalência parece acompanhar as tendências relatadas para a obesidade. Há uma grande preocupação com o aumento da prevalência desta síndrome, uma vez que seus componentes são considerados fatores de risco para as doenças cardiovasculares, em especial a doença aterosclerótica (I Diretriz Brasileira de Diagnóstico e Tratamento da Síndrome Metabólica, 2005). Apesar desta síndrome apresentar baixa prevalência em adolescentes, e de não existir um critério específico

de classificação para esta população, vários componentes da síndrome metabólica têm sido relatados nestes indivíduos, como resultado do aumento da prevalência de obesidade nesta faixa etária (Gilardini et al., 2006).

A resistência insulínica, caracterizada como uma diminuição da ação da insulina nos tecidos periféricos, corresponde ao principal componente desta síndrome. Isto porque a hiperinsulinemia, resultante da resistência insulínica, é responsável pelo desenvolvimento dos componentes da síndrome metabólica (Carvalho e Saad et al., 2006). A resistência insulínica parece ser resultante da obesidade, principalmente a obesidade central (St-Onge et al., 2004).

A associação entre obesidade e resistência insulínica pode ser devido à presença de um estado pró-inflamatório subclínico. Atualmente, a obesidade vem sendo designada como uma doença inflamatória crônica subclínica, tendo em vista a capacidade do tecido adiposo em sintetizar mediadores envolvidos no processo de inflamação. Tanto citocinas pró-inflamatórias quanto as antiinflamatórias são secretadas por esse tecido, e parecem desencadear um processo de inflamação subclínica sistêmica. Dessa forma, quanto maior a quantidade de tecido adiposo presente no indivíduo, maiores os níveis de substâncias pró-inflamatórias produzidas pelo tecido adiposo e maiores os níveis destas substâncias na corrente sanguínea (Kapiotis et al., 2006).

A inflamação crônica subclínica parece ser elo entre obesidade e resistência insulínica, podendo ser um importante fator de risco para o desenvolvimento dos distúrbios encontrados na síndrome metabólica. Indivíduos com síndrome metabólica apresentam elevados níveis de citocinas e moléculas de adesão, indicando a presença de inflamação subclínica e, possivelmente, de disfunção endotelial nesta população (Festa et al., 2000; Shoelson et al., 2006).

Em virtude da importância do tecido adiposo no desenvolvimento de doenças cardiovasculares, a composição corporal tem sido relatada como um importante parâmetro a ser avaliado (De Lorenzo et al., 2007). Apesar de estar diretamente associada com a adiposidade, pouco se sabe sobre a relação entre a expressão de marcadores inflamatórios e a composição corporal, principalmente em adolescentes.

Um campo interessante para estudos parece ser a avaliação da expressão dos marcadores inflamatórios em indivíduos com peso corporal normal de acordo com a estatura, gênero e idade e com excesso de gordura corporal total, em especial na população adolescente. Estudos indicam que indivíduos com peso corporal normal e elevado percentual de gordura corporal apresentam distúrbios metabólicos

semelhantes aos encontrados em indivíduos obesos, ou seja, naqueles com peso e gordura corporal elevados (Conus et al., 2004; De Lorenzo et al., 2006; De Lorenzo et al., 2007).

Sendo a inflamação subclínica um dos principais determinantes da resistência insulínica, e das alterações ocorridas na síndrome metabólica, o diagnóstico precoce destas alterações e a compreensão dos componentes que influenciam a progressão destes distúrbios em adolescentes podem ser eficazes na prevenção do desenvolvimento de doenças cardiovasculares na vida adulta.

Pretende-se com este estudo avaliar a relação entre a presença de adiposidade elevada e sua correlação com alguns parâmetros bioquímicos, além da expressão dos mediadores inflamatórios TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-10, mesmo que estejam em condição subclínica.

O conhecimento da dinâmica do processo inflamatório em adolescentes com excesso de peso pode contribuir para que ações de prevenção possam ser desenvolvidas, a fim de se evitar complicações futuras e o conseqüente aumento da demanda dos serviços de saúde pública no controle e tratamento destas doenças, que na maioria das vezes são evitáveis.

## Referências Bibliográficas

- Albano RD, Souza SB. Estado nutricional de adolescentes: “risco de sobrepeso” e “sobrepeso” em uma escola pública do Município de São Paulo. *Cad Saúde Pública* 2001, 17(4):941-7.
- Carvalho JBC, Saad MJ. A. Doenças Associadas à Resistência à Insulina/Hiperinsulinemia, Não Incluídas na Síndrome Metabólica. *Arq Bras Endocrinol Metab* 2006, 50(2):360-7.
- Conus F, Allison DB, Rabasa-Lhoret R, St-Onge M, St-Pierre DH, Tremblay-Lebeau A, Poehlman ET. Metabolic and behavioral characteristics of metabolically obese but normal-weight women. *J Clin Endocrinol Metab* 2004, 89(10):5013-20.
- Daniels SR, Arnett DK, Eckel RH, Gidding SS, Hayman LL, Kumanyika S, Robinson TN, Scott BJ, Jeor SS, Williams CL. Overweight in children and adolescents. Pathophysiology, consequences, prevention, and treatment. *Circulation* 2005, 111(15):1999 – 2012.
- De Lorenzo A, Del Gobbo V, Premrov MG, Bigioni M, Galvano F, Di Renzo L. Normal-weight obese syndrome: early inflammation? *Am J Clin Nutr* 2007, 85(1):40-5.
- De Lorenzo A, Martinoli R, Vaia F, Di Renzo L. Normal weight obese (NWO) women: An evaluation of a candidate new syndrome. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2006, 16(8):513-23.
- Diretrizes Brasileiras de Obesidade. Associação Brasileira para o Estudo da Obesidade e da Síndrome Metabólica 2007.
- Festa A, D’Agostino RJr, Howard G, Mykkänen L, Tracy RP, Haffner SM. Chronic subclinical inflammation as part of the insulin resistance syndrome as part of the Insulin Resistance Atherosclerosis Study (IRAS). *Circulation* 2000, 102(1):42-7.
- Garcia GCB, Gambardella AMD, Frutuoso MFP. Estado nutricional e consumo alimentar de adolescentes de um centro de juventude da cidade de São Paulo. *Rev Nutr* 2003, 16(1):41-50.
- Gilardini L, McTernan PG, Girola A, Silva NF, Alberti L, Kumar S, Invitti C. Adiponectin is a candidate marker of metabolic syndrome in obese children and adolescents. *Atherosclerosis* 2006, 189(2):401-7.
- I Diretriz Brasileira de Diagnóstico e Tratamento da Síndrome Metabólica. *Arq Bras Cardiol* 2005, 84 (supl. 1).
- Kapiotis S, Holzer G, Schaller G, Haumer M, Widhalm H, Weghuber D, Jilka B, Röggl G, Wolzt M, Widhalm K, Wagner OF. A proinflammatory state is detectable in obese children and is accompanied by functional and morphological vascular changes. *Arterioscler Tromb Vasc Biol* 2006, 26(11):2541-6.

Oehlschlaeger MHK, Pinheiro RT, Horta B, Gelatti C, San'Tana P. Prevalência e fatores associados ao sedentarismo em adolescentes de área urbana. Rev Saúde Pública 2004, 38(2):157-63.

Santos CRB, Portella ES, Ávila SS, Soares EA. Fatores dietéticos na prevenção e tratamento de comorbidades associadas à síndrome metabólica. Rev Nutr 2006, 19(3):389-401.

Shoelson SE, Lee J, Goldfine AB. Inflammation and insulin resistance. J Clin Invest 2006, 116(7):1793-801.

St-Onge M, Janssen I, Heymsfield SB. Metabolic syndrome in normal-weight Americans. New definition of the metabolically obese, normal-weight individual. Diabetes Care 2004, 27(9):2222-8.

## **2 REVISÃO DE LITERATURA**

### **Inflamação crônica subclínica em adolescentes: papel do tecido adiposo no desenvolvimento de doenças crônicas não-transmissíveis.**

Carvalho, G.Q.; Pereira, P.F; Serrano, H.M.S; Franceschini, S.C.C.; De Paula, S.O.; Priore, S.E; Peluzio, M.C.G.

#### **Resumo**

A obesidade se caracteriza como epidemia mundial, sendo cada vez maior a prevalência e cronicidade deste distúrbio em indivíduos jovens. Em crianças e adolescentes, a obesidade aumenta o risco de desenvolvimento de comorbidades na idade adulta. Atualmente, o excesso de tecido adiposo tem sido associado ao desenvolvimento de inflamação crônica subclínica e, conseqüentemente, de aterosclerose e resistência insulínica. Em virtude da importância do tecido adiposo no desenvolvimento de doenças cardiovasculares, este tecido tem sido cada vez mais estudado. A inflamação subclínica tem sido considerada o elo entre obesidade e síndrome metabólica. Pouco se sabe a relação entre essas patologias em populações jovens. Esta revisão trata da relação entre obesidade e presença de doenças crônicas não-transmissíveis em adolescentes. Também discorre sobre o papel do tecido adiposo no desenvolvimento de inflamação subclínica, enfocando indivíduos obesos e “metabolicamente obesos de peso normal”, em especial, os adolescentes.

**Palavras-chave:** Adolescentes, obesidade, tecido adiposo, síndrome metabólica, inflamação subclínica.

## **ABSTRACT**

### **Subclinical inflammation in adolescents: paper of the adipose tissue in the development of the non-communicable chronic diseases.**

Carvalho, G.Q.; Pereira, P.F; Serrano, H.M.S; Franceschini, S.C.C.; De Paula, S.O.; Priore, S.E; Peluzio, M.C.G.

The obesity characterizes as world epidemic, with increase prevalence and cronicity of this disturbance in young individuals. In children and teenagers, the obesity increases the risk of development of comorbidades in the adult age. Nowadays, the excess of adipose tissue is associated to the development of subclinical chronic inflammation, atherosclerosis and insulin resistance. In view of the importance of the adipose tissue in the development of cardiovascular diseases, this tissue has been very studied. The inflammation has been considered the link between obesity and metabolic syndrome. Little is knows the relation between these pathologies in young populations. This revision focuses upon the relation between obesity and presence of non-communicable chronic diseases in adolescents. It also runs about the paper of the adipose tissue in the development of subclinical inflammation, focusing obese and “metabolically obese individuals of normal weight”, especially, the teenagers.

**Key-words:** Adolescents, obesity, adipose tissue, metabolic syndrome, subclinical inflammation.

## ***2.1 Doenças crônicas na adolescência***

### ***2.1.1 Caracterização da adolescência***

A adolescência, período de transição que se inicia com a puberdade, é marcada por dinâmicas mudanças fisiológicas e psicológicas (Daniels et al., 2005). Fisiologicamente a adolescência é uma fase de grande importância, pois nela ocorre o denominado "segundo estirão de crescimento", que corresponde à última fase de desenvolvimento acelerado da vida do indivíduo. Dessa maneira, acontece o incremento estatural final, a definição das formas do corpo, a maturação sexual e óssea. Nesta fase, são adquiridos cerca de 50% do peso corporal e 20-25% da estatura de um indivíduo. As alterações na composição corporal são distintas entre os gêneros. Enquanto nas meninas ocorre o acúmulo de gordura corporal, os meninos tendem a ganhar maior quantidade de massa muscular (Mascarenhas et al., 2005).

Durante a adolescência ocorre o desenvolvimento dos órgãos sexuais, sendo evidenciado o desenvolvimento das características sexuais secundárias. O estágio de maturação sexual é determinado por fatores genéticos e ambientais, apresentando importante variação interindividual quanto ao período de iniciação e duração das transformações. Desse modo, é possível a presença de adolescentes com idades semelhantes que estejam em diferentes estágios da maturação sexual. Estima-se que o início e o desenrolar do processo de maturação sexual envolva o período de 10 e 14 anos (Moreira et al., 2004; Oliveira e Veiga, 2005). A menarca é considerada o marcador da maturação sexual em meninas, período no qual ocorre desenvolvimento sexual e início da desaceleração do crescimento (Vitalle et al., 2003).

Diversas características biológicas como crescimento estatural, ganho de peso, desenvolvimento muscular e alterações bioquímicas são influenciadas pelo estágio de maturação sexual (Mascarenhas et al., 2005). A composição corporal e, mais especificamente, a adiposidade, parece ser dependente do estágio de maturação sexual. Em meninas, existe uma relação direta entre incremento de adiposidade e maturação sexual (Moreira et al., 2004). Assim, torna-se importante a avaliação do estágio de maturação sexual para interpretação dos dados antropométricos e conseqüente determinação do estado nutricional de adolescentes (Oliveira e Veiga, 2005).

A adolescência pode ser dividida teoricamente por faixas etárias, de acordo com a velocidade em que ocorrem os processos de estirão e maturação sexual

(Iuliano et al., 2004). Dos 10 aos 14 anos de idade consiste na fase inicial da adolescência, momento de maior crescimento estatural e de maturação sexual decorrentes da rápida elevação da secreção de hormônios. A fase final da puberdade, ou fase tardia, compreende a faixa etária de 15 a 19 anos e é caracterizada pela desaceleração destes processos. O incremento estatural e as mudanças características da adolescência diminuem a velocidade de ocorrência, ou mesmo cessam. Supõe-se que na fase tardia praticamente todos os adolescentes passaram pelo rápido estirão, e se encontram em uma fase de grande estabilização em relação à sua composição corporal (Garcia et al., 2003; Iuliano et al., 2004).

### *2.1.2 Obesidade*

A obesidade é considerada a deposição excessiva de tecido adiposo no organismo em decorrência do desequilíbrio entre ingestão e gasto energético. O excesso de tecido adiposo é responsável por alterações metabólicas, e associa-se ao maior risco de desenvolvimento de comorbidades, como: dislipidemias, resistência insulínica, diabetes mellitus e hipertensão arterial. Considerada epidemia mundial, sua prevalência e cronicidade atingem níveis alarmantes tanto em adultos quanto em crianças. A obesidade tem se elevado nos dias atuais tendo em vista o aumento do sedentarismo e da adoção de práticas alimentares inadequadas, como o elevado consumo de alimentos ricos em gorduras, principalmente as saturadas, açúcar refinado, bem como o menor consumo de frutas, hortaliças e cereais integrais (WHO, 1998; Diretrizes Brasileiras de Obesidade, 2007).

São inúmeras as enfermidades e complicações provenientes da obesidade, incluindo dificuldades respiratórias, problemas dermatológicos, distúrbios do aparelho motor e desenvolvimento de doenças crônicas não-transmissíveis (Monteiro, 2000). Segundo Francischi et al. (2000), o aumento de 10% no peso corporal pode aumentar 6,0 mmHg na pressão sistólica e 4,0 mmHg na pressão diastólica. Já o indivíduo que possui peso 20% superior ao peso desejável pode ter um aumento de 20% de chances de morrer por todas as causas e o risco de mortalidade por diabetes mellitus praticamente dobra. Para esse mesmo indivíduo aumentam, ainda, em 40% as chances de desenvolver disfunção da vesícula biliar e em 25% o risco de desenvolvimento de doenças cardiovasculares. Quando o aumento de peso é superior a 40% do peso desejável, os riscos de mortalidade são de 55%, o risco de morte por diabetes mellitus é quatro vezes maior e as chances de desenvolvimento de doenças cardiovasculares aumentam em 70%.

A adolescência é caracterizada por baixa prevalência de doenças infecto-parasitária, entretanto, as doenças crônicas não-transmissíveis têm se destacado como importantes distúrbios que acometem esta população (Albano e Souza, 2001). A adolescência é um período crítico, pois alterações ocorridas nesta fase da vida podem persistir durante a vida adulta (Frutuoso et al., 2003). Segundo Daniels et al. (2005), mais de 80% dos adolescentes obesos serão adultos obesos. Entretanto, independente dos efeitos da obesidade infantil no Índice de Massa Corporal (IMC) em adultos, o aumento da obesidade na adolescência aumenta o risco de morbidade na vida adulta (Koletzko et al., 2002). Assim, a adolescência pode ser uma importante fase para possíveis intervenções na prevenção das morbidades.

O aumento da prevalência de sobrepeso/obesidade segue as tendências relatadas para a população adulta no Brasil. Enquanto a prevalência de desnutrição foi reduzida em 50%, o sobrepeso dobrou na população de brasileiros com idade inferior a 20 anos no período de 1975 a 1997 nas regiões sudeste e nordeste (Brandão et al., 2005). O aumento da prevalência da obesidade nesta população reflete um balanço energético positivo, seja por aumento do consumo calórico ou por redução do dispêndio energético, ou ambos (Albano e Souza, 2001). Nos Estados Unidos, mais de 15% dos adolescentes entre 12 a 19 anos estão acima do peso (Baker et al., 2005).

Estudos apontam para um inadequado consumo alimentar pelos adolescentes, com preferência de alimentos de alto valor calórico, ricos em gordura saturada, colesterol, açúcar e sal, além da ingestão de quantidades reduzidas de alimentos ricos em fibras, vitaminas e minerais, como frutas, hortaliças e cereais integrais (Vieira et al., 2002; Garcia et al., 2003; Iuliano et al., 2004). Mesmo quando os vegetais estão presentes na alimentação dos adolescentes, a quantidade ingerida não é suficiente para atender as demandas de micronutrientes, especialmente de vitaminas A e C (Vitolo, 2003).

Associado ao inadequado consumo alimentar, o aumento do sedentarismo imposto pela sociedade moderna e verificado em adolescentes contribui para o agravamento do estado nutricional desta população. A reduzida prática de atividade física contribui para a redução do gasto energético, responsável pelo aumento do sobrepeso/obesidade, e está associado ao aumento da prevalência de dislipidemias, alterações no metabolismo da glicose e aumento da pressão arterial (Silva e Malina, 2000; Oehlschlaeger et al., 2004).

Apesar de pouca informação acerca das conseqüências da obesidade na infância e adolescência, é consenso que os efeitos desta doença são similares em crianças e adultos, sendo de curto e médio prazo na infância, podendo se estender na vida adulta (Koletzko et al., 2002; Daniels et al., 2005). É grande a probabilidade de um adolescente obeso tornar-se um adulto obeso e/ou apresentar aumento da prevalência de dislipidemia, hipertensão, diabetes e resistência insulínica na idade adulta (Albano e Souza, 2001; Kelishadi et al., 2006).

Segundo Monteiro et al. (2000), o sobrepeso e a obesidade na adolescência são considerados fatores de risco para desenvolvimento de doenças cardiovasculares, câncer e artrite na vida adulta. Entretanto, há evidências acerca da presença de dislipidemias e hipertensão já em adolescentes. De acordo com Oliveira et al. (2004) pelo menos 60% das crianças e adolescentes com excesso de peso apresentam pelo menos um fator de risco para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares como hipertensão, dislipidemia ou hiperinsulinemia, e 20% apresentam dois ou mais fatores de risco.

### 2.1.3 Síndrome metabólica

A síndrome metabólica corresponde a uma série de alterações hemodinâmicas e metabólicas, freqüentemente presentes no indivíduo obeso. É representada por um conjunto de fatores de risco cardiovascular geralmente associados à deposição central de gordura e à resistência à insulina. Segundo a *Organização Mundial de Saúde* (OMS), caracteriza-se por alteração no metabolismo da glicose (redução da tolerância à glicose/diabetes mellitus) e/ou resistência insulínica, além de dois ou mais dos seguintes fatores: hipertensão arterial sistêmica, obesidade de distribuição central, IMC elevado, microalbuminúria, valores reduzidos de HDL-colesterol e hipertrigliceridemia (WHO, 1998; I Diretriz Brasileira de Diagnóstico e Tratamento da Síndrome Metabólica, 2005). Autores relatam que a presença de síndrome metabólica pode aumentar em duas a três vezes o risco de morbidade cardiovascular, quando comparado com indivíduos sem a síndrome (Filho et al., 2006).

Os parâmetros diagnósticos mais utilizados na prática clínica para a síndrome metabólica foram relatados em 2001 pelo *National Cholesterol Education Program – Adult Pannel III* (NCEP-ATPIII), o qual não exige a comprovação de resistência insulínica, já que este é um parâmetro pouco viável na prática clínica (NCEP, 2001). Nesse sentido, o NCEP-ATPIII têm enfatizado a importância da avaliação da circunferência abdominal de modo a se estimar a adiposidade na premissa que este é

o índice que mais se relaciona com a resistência à insulina e suas conseqüências. Este também é o critério recomendado pela I Diretriz Brasileira de Diagnóstico e Tratamento da Síndrome Metabólica e pela Sociedade Brasileira de Diabetes devido à sua simplicidade e praticidade (I Diretriz Brasileira de Diagnóstico e Tratamento da Síndrome Metabólica, 2005).

Conseqüentemente ao aumento do sobrepeso/obesidade na população adolescente, a elevação da prevalência de doenças ou distúrbios associados à obesidade também tem sido relatada. A obesidade aumenta o risco de morbidade e mortalidade por doenças crônicas não-transmissíveis e está associada com o desenvolvimento de resistência insulínica. Dessa forma, aumenta-se o risco de alterações presentes na síndrome metabólica. Novos casos desta síndrome estão sendo diagnosticados como resultado do aumento da adiposidade em adolescentes, e em especial, do aumento da adiposidade visceral (Kelishadi et al., 2006).

Não há consenso sobre a definição de síndrome metabólica em crianças e adolescentes. Brandão et al. (2005) relataram a possibilidade de utilização de parâmetros semelhantes aos utilizados pelo NCEP-ATPIII para diagnóstico da síndrome metabólica. Neste caso, o Índice de Massa Corporal seria utilizado em substituição à circunferência abdominal, uma vez que não há consenso acerca dos pontos de corte da circunferência abdominal para adolescentes. No estudo de Cook et al. (2008), avaliando os dados do “National Health and Nutrition Examination Survey” (NHANES) de 1999-2002, verificou-se que, utilizando diferentes definições de síndrome metabólica, a prevalência de síndrome metabólica variava de 2,0% a 9,4% no total de adolescentes, e 12,4% a 44,2% em adolescentes obesos.

Utilizando dados do NHANES de 1988-1994, a prevalência de síndrome metabólica em adolescentes foi apresentada, considerando os parâmetros recomendados pelo NCEP-ATPIII e adaptando os pontos de corte para adolescentes (Cook et al., 2003). Neste estudo, cerca de 4% da amostra de adolescentes, e 30% daqueles obesos, apresentavam síndrome metabólica.

Existe relação direta entre a prevalência de obesidade e síndrome metabólica na adolescência, sugerindo que esta síndrome também possa apresentar comportamento ascendente nos dias atuais (Brandão et al., 2005). De acordo com Gilardini et al. (2006), a síndrome metabólica acomete cerca de um quarto das crianças e adolescentes obesos. Segundo Valle et al. (2002), a aparente associação entre a obesidade e a síndrome metabólica se deve à correlação entre a obesidade e a

resistência insulínica, e ao fato de a resistência insulínica ser o fator fisiopatológico mais importante no desenvolvimento das alterações da síndrome metabólica.

- **Resistência Insulínica:** A presença de resistência insulínica tem sido relatada em adolescentes, principalmente naqueles obesos (Dunger et al., 2005). Adolescentes com intolerância à glicose possuem maior quantidade de tecido adiposo visceral e menor quantidade de tecido adiposo subcutâneo, sugerindo que, também na adolescência, há uma influência do tecido adiposo visceral na gênese da resistência insulínica (Rodríguez et al., 2004). Segundo Lee et al. (2006), utilizando dados de adolescentes de 12 a 19 anos participantes do NHANES de 1999-2002, a prevalência de resistência insulínica em adolescentes obesos foi de 52,1%. A resistência insulínica é um das primeiras desordens detectadas, e parece preceder o aparecimento dos demais componentes da síndrome metabólica, como diabetes “mellitus”, hipertensão arterial e dislipidemias. A hiperinsulinemia é considerada um fator comum no desenvolvimento de desordens metabólicas e, dessa forma, um fator de risco independente para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares na vida adulta (Sookoian et al., 2005).

- **Diabetes Mellitus tipo 2:** Antes considerada uma doença diagnosticada apenas em adultos, o Diabetes mellitus tipo 2 está sendo relatada também em crianças e adolescentes. O aumento da prevalência de diabetes mellitus tipo 2 na população adolescente está relacionada ao aumento do sobrepeso/obesidade e da resistência insulínica, e da diminuição da tolerância à glicose (Oliveira et al., 2004). Estima-se que 4% dos adolescentes obesos possuam diabetes mellitus tipo 2 (Baker et al., 2005).

- **Dislipidemias:** A presença de dislipidemias em adolescentes tem sido cada vez mais freqüente. A dislipidemia é uma das alterações que aparece na adolescência e persistem durante a vida adulta (Rodríguez et al, 2004). Sua relação com o desenvolvimento de aterosclerose é bastante conhecida, sendo importante sua prevenção, diagnóstico precoce e tratamento. Segundo Valle et al. (2002), adolescentes obesos apresentavam maiores níveis de insulinemia e de triglicédeos.

- **Hipertensão arterial:** A hipertensão no adolescente possui etiologia multifatorial, sendo influenciada por fatores genéticos, biológicos e ambientais. A obesidade tem sido considerada um importante preditor no desenvolvimento de hipertensão nesta faixa etária (Gaya et al., 2005). Segundo Katona et al (2006), estudos epidemiológicos estimam que a prevalência de hipertensão na adolescência esteja entre 0.4 a 12%. Entretanto, apesar da prevalência não ser muito alta, o

diagnóstico de hipertensão tem sido importante, uma vez que existe associação entre hipertensão na adolescência e na vida adulta. A resistência insulínica parece ser um fator importante no aparecimento da hipertensão, precedendo a elevação da pressão arterial. Oliveira et al. (2004) e Valle et al. (2002) demonstraram forte correlação entre resistência insulínica e elevação da pressão arterial em adolescentes. Os valores de pressão arterial em adolescentes também parecem ser influenciados pelo estágio de maturação sexual (Gaya et al., 2005).

## **2.2 O tecido adiposo como órgão endócrino**

### *2.2.1 Tecido adiposo e inflamação subclínica*

O tecido adiposo tem sido considerado o elo entre a obesidade e o desenvolvimento de doenças crônicas não-transmissíveis. Isto porque este tecido, antes considerado mero reservatório energético, hoje é reconhecido como centro regulador do metabolismo corporal, com importantes funções. O tecido adiposo é um órgão endócrino muito ativo que, além de sua função energética - estocando calorias na forma de triglicerídeos - secreta uma enorme variedade de proteínas, as quais estão envolvidas em processos endócrinos, parácrinos e/ou autócrinos (Curat et al., 2004). Vários sinais, como a liberação dos hormônios insulina, cortisol e as catecolaminas, possuem influência direta na secreção de substâncias pelos adipócitos. Essas substâncias, conhecidas como adipocinas, estão relacionadas na regulação de processos que contribuem para o desenvolvimento de resistência à insulina, hipertensão arterial, diabetes “mellitus” tipo 2 e dislipidemia (Hermsdorff & Monteiro, 2004; Filho et al., 2006).

O conceito de tecido adiposo como órgão endócrino surgiu em 1994, quando o tecido adiposo foi descoberto como sendo o principal local de secreção da leptina. A partir de então, mais estudos foram realizados neste sentido, sendo hoje conhecidas mais de 50 diferentes adipocinas com formas estruturais e funções distintas (Trayhurn, 2005).

As adipocinas atuam nas mais diversas funções, regulando o apetite e o balanço energético, a imunidade, a sensibilidade à insulina, a angiogênese, a pressão arterial, o metabolismo lipídico e a homeostasia. Em função disto, o tecido adiposo é considerado um importante órgão endócrino que controla o metabolismo do organismo. Outro ponto a ser destacado é que todas essas funções estão direta ou

indiretamente ligadas ao desenvolvimento de doenças cardiovasculares. Dessa forma, quando ocorre um desequilíbrio na produção e/ou atuação das adipocinas, pode haver o aparecimento de doenças cardiovasculares (Trayhurn, 2005).

Recentemente, os estudos apontaram para importante participação do tecido adiposo no desenvolvimento de inflamação crônica subclínica. Várias substâncias secretadas pelos adipócitos modulam o processo inflamatório do organismo, sendo as principais: a leptina, a adiponectina, as interleucinas (IL) e o Fator de Necrose Tumoral-alfa (TNF- $\alpha$ ). TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-1 $\beta$  são os três maiores biomarcadores do processo de inflamação e são encontrados em níveis elevados em células inflamatórias ativadas, quando comparado à outras células do organismo (Huang et al., 2004).

O TNF- $\alpha$  é uma das principais citocinas sintetizadas por macrófagos em estímulo à substâncias pró-inflamatórias. Em monócitos o TNF- $\alpha$  é produzido em pequenas quantidades em resposta à ativação do fator de transcrição nuclear NF- $\kappa$ B (Frankenberger et al., 1994).

O estudo de Wang et al. (2005) demonstrou o efeito do TNF- $\alpha$  na produção de adipocinas relacionadas ao processo inflamatório. O tratamento de adipócitos humanos com TNF- $\alpha$  foi responsável por aumento substancial da expressão de mRNA de IL-6, TNF- $\alpha$  e MCP-1 (*monocyte chemoattractant protein-1*). Isto significa que o TNF- $\alpha$  pode ter um papel central no desenvolvimento e progressão do processo inflamatório subclínico visto em indivíduos obesos.

A sugestão para a função do TNF- $\alpha$  secretado pelo adipócito se relaciona à sua ação como adipostato, com efeito central na regulação do peso corporal. Os principais efeitos periféricos desta citocina correspondem à inibição da Lipase Lipoproteica (LPL), diminuição da expressão do transportador de glicose GLUT 4 e inibição da atividade do receptor de insulina (Bulló et al, 2002). Isto corresponde a uma tentativa do organismo em cessar o ganho de peso corporal por meio da inibição da glicogênese e lipogênese. No entanto, como efeito adverso, tais alterações metabólicas induziriam ao desenvolvimento de dislipidemia, hiperglicemia e resistência insulínica, os quais compõem os fatores de risco para síndrome metabólica. A IL-6, da mesma forma que o TNF- $\alpha$ , inibe a expressão da LPL, porém, diferente do TNF- $\alpha$ , não estimula a lipólise (Kern et al, 2001).

No estudo de Bulló et al. (2002), avaliando a expressão de TNF- $\alpha$  de tecido adiposo subcutâneo de 96 adultos com idade entre 18 e 65 anos, foi possível verificar

o aumento da expressão de TNF- $\alpha$  em indivíduos obesos, sendo essa expressão proporcional à quantidade de tecido adiposo da amostra. Além disso, os autores demonstraram que o TNF- $\alpha$  possuía correlação inversa ( $p < 0,05$ ) com atividade da LPL.

Sabe-se, então, que a obesidade é caracterizada pelo estado de inflamação crônica subclínica, com aumento da expressão de substâncias pró-inflamatórias e inibição daquelas antiinflamatórias (Kapiotis et al., 2006). O mecanismo proposto por autores para ativação do sinal inflamatório na obesidade consiste na ativação do fator de transcrição nuclear- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) em adipócitos, hepatócitos e macrófagos, em decorrência da presença de IL-6 e TNF- $\alpha$ , principalmente (Tak e Firestein, 2001; Shoelson et al., 2006). O NF- $\kappa$ B é claramente um dos mais importantes reguladores da expressão de genes pró-inflamatórios, como as citocinas TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-8. A ativação do NF- $\kappa$ B aumenta a expressão de moléculas de adesão (E-selectina, VCAM-1 e ICAM-1), enquanto que sua inibição reduz a adesão e transmigração leucocitária, e é altamente ativado em casos de presença de inflamação, em inúmeras doenças, como a aterosclerose e a obesidade (Tak e Firestein, 2001).

A secreção de substâncias inflamatórias pelos adipócitos, mesmo em pequenas quantidades, contribui para indução da inflamação e ativação da resposta imune. Esses sinais inflamatórios emitidos pelo tecido adiposo, em indivíduos obesos, podem ter efeitos locais e sistêmicos na promoção da aterosclerose e resistência insulínica (Berg et al., 2004). As adipocinas estão associadas com o desenvolvimento de aterosclerose, por induzir disfunção endotelial. Em resposta aos marcadores inflamatórios, ocorre aumento da adesão leucocitária no endotélio e da migração de células envolvidas no processo de inflamação para o espaço subendotelial, favorecendo a inflamação local e o desenvolvimento de placas ateroscleróticas (Lau et al., 2005).

Pasceri et al. (2000) observaram que a incubação células endoteliais de cordão umbilical humano e de artéria coronariana humana em meio contendo proteína C reativa (10 $\mu$ g/mL), durante período de 24h, induziu aumento de 10 vezes na expressão de ICAM-1 (molécula de adesão intercelular) e quantidade significativa de VCAM-1 (molécula de adesão vascular) e E-selectina. A indução da expressão de moléculas de adesão foi similar em células incubadas por 24h em meio contendo IL-1 $\beta$  (10ng/mL). Em condições normais, sem estímulo de substâncias inflamatórias, as

células endoteliais humanas apresentaram baixa expressão de ICAM-1 e nenhuma expressão de VCAM e E-selectina.

No estudo de Bruun et al. (2004), foi possível verificar que a secreção *in vitro* de IL-8 era quatro vezes maior no tecido adiposo visceral, em comparação com o tecido adiposo subcutâneo. Já a expressão de IL-8 era duas vezes maior nas células oriundas do tecido adiposo visceral. Quando as células foram cultivadas por 72h em meio contendo Dexametazona, um corticosteróide com função antiinflamatória, a produção de IL-8 foi atenuada em 50%, independente da localização do tecido adiposo. Por outro lado, o cultivo das células em meio adicionado de IL-1 – uma citocina pró-inflamatória – aumentou a produção de IL-8 em cerca de 15 vezes. Isto sugere uma possível retroalimentação do estado pró - inflamatório encontrado em indivíduos obesos.

Bulló et al. (2002) avaliaram a expressão de TNF- $\alpha$  em tecido adiposo subcutâneo de pacientes obesas (IMC entre 27 e 40 kg/m<sup>2</sup>) e obesas mórbidas (IMC > 40 kg/m<sup>2</sup>) sem diabetes, e concluiu que, em comparação com mulheres eutróficas, houve aumento da expressão de TNF- $\alpha$ . Este aumento ocorreu em proporção à magnitude da deposição de gordura, independente da presença de diabetes *mellitus* tipo 2.

Em outro estudo de Bruun et al. (2006), foi verificado que a adoção de dieta hipocalórica e de atividade física melhorou a sensibilidade insulínica e reduziu a inflamação subclínica de indivíduos com obesidade grave. Neste estudo, 27 indivíduos mudaram o estilo de vida por meio da adoção de dieta hipocalórica e atividade física diária. Após 15 semanas de intervenção, houve aumento da sensibilidade insulínica e da concentração de adiponectina, e redução do peso corporal, proteína C reativa, IL-6, IL-8 e MCP-1.

A expressão das adipocinas parece aumentar de acordo com volume dos adipócitos. O tecido adiposo visceral secreta maiores concentrações de adipocinas ligadas a processos pró-inflamatórios, seguido do tecido adiposo subcutâneo abdominal e do tecido adiposo glúteo-femural (Hermsdorff e Monteiro, 2004). Indivíduos obesos, principalmente aqueles com acúmulo de gordura visceral, parecem apresentar maiores concentrações sanguíneas de citocinas pró-inflamatórias, as quais são reduzidas com a diminuição de gordura corporal. Kern et al. (2001) avaliaram a expressão e secreção de TNF- $\alpha$  e IL-6 de tecido adiposo abdominal subcutâneo de 50 indivíduos eutróficos e obesos sem diabetes. Segundo os autores, secreção de TNF- $\alpha$  e IL-6 era maior nos indivíduos com os maiores valores de IMC.

Já a expressão de TNF- $\alpha$  e IL-6 não se correlacionou com o IMC. Entretanto não foi avaliada a expressão e secreção de citocinas em função do percentual de gordura corporal, não considerando a composição corporal.

Manigrasso et al. (2005) observaram redução na concentração de IL-10 e adiponectina em indivíduos com obesidade do tipo andróide, ou seja, naqueles indivíduos com predominante acúmulo de gordura na região abdominal. No estudo de Visser et al. (1999), utilizando os dados de 16616 participantes do “The Third National Health and Nutrition Examination Survey” (NHANES III) – uma amostra representativa da população dos Estados Unidos do período de 1988 a 1994 - verificaram associação entre IMC e proteína C reativa. A relação cintura – quadril também se associou com a proteína C reativa, independente do IMC. Resultado semelhante foi descrito por Festa et al. (2001). Avaliando os dados de 1625 indivíduos participantes do estudo IRAS (*The Insulin Resistance Atherosclerosis Study*), os autores encontraram correlação positiva ( $r \geq 0,35$ ) entre proteína C reativa ultra-sensível e os parâmetros de adiposidade, como IMC, circunferência da cintura e gordura corporal, este último avaliado por meio da bioimpedância elétrica.

Apesar do tecido adiposo visceral ser considerado metabolicamente mais ativo, outros locais, como o tecido adiposo intermuscular, abdominal subcutâneo e visceral, também são associados ao aumento da expressão de marcadores inflamatórios, principalmente IL6 e TNF- $\alpha$ , e diminuição da sensibilidade insulínica aos tecidos periféricos (Hermsdorff e Monteiro, 2004; Sites et al, 2002). Assim, o aumento da massa de tecido adiposo pode caracterizar um estado de inflamação subclínica. Dessa forma, estimar o conteúdo total de gordura corporal pode ser útil no estudo da influência da gordura corporal na expressão de marcadores inflamatórios.

Com o aumento do tecido adiposo, o aumento da secreção de substâncias pró-inflamatórias pelos adipócitos propicia a migração e acúmulo de monócitos circulantes da corrente sanguínea para este tecido por mecanismo de quimiotaxia, favorecido pela secreção de quimiocinas pelo tecido adiposo, como o MCP-1. Os monócitos então infiltram no tecido adiposo por meio de mudança conformacional do citoesqueleto, o que permite à célula alterar seu tamanho e forma a fim de atravessar os espaços intercelulares, processo esse conhecido como diapedese (Curat et al., 2004). Uma vez instalados, os monócitos se diferenciam em macrófagos e permanecem ativados neste tecido, sendo os responsáveis pela ampliação do sinal

inflamatório por meio do aumento da secreção de citocinas pró - inflamatórias (Shoelson et al., 2006).

O tecido adiposo é composto por vários tipos celulares, sendo os adipócitos as células predominantes. Os outros tipos celulares encontrados no tecido adiposo branco incluem as células do estroma, das quais aproximadamente 10% correspondem a macrófagos (Curat et al. 2004). Os macrófagos presentes no tecido adiposo são provenientes da infiltração de monócitos circulantes e/ou de pré-adipócitos que possuem a capacidade de se diferenciarem em macrófagos na presença de estímulos para sua diferenciação – o que muitas vezes corresponde às próprias substâncias pró - inflamatórias secretadas pelo tecido adiposo (Fantuzzi, 2005).

Pesquisadores conseguiram isolar macrófagos de tecido adiposo e avaliar a participação destas células nos níveis de citocinas secretadas pelo tecido adiposo (Weisberg et al., 2003). Concluiu-se que as citocinas secretadas pelo tecido adiposo são provenientes tanto da secreção de adipócitos quanto de macrófagos residentes neste tecido. Estudos sobre a expressão gênica de células do tecido adiposo mostraram que os macrófagos residentes secretam quase todo TNF- $\alpha$ , enquanto que o IL-6 é igualmente expresso por macrófagos residentes, adipócitos e células do estroma vascular (não-macrófagos) (Weisberg et al., 2003).

Apesar do rápido *clearance* das citocinas após sua secreção, o tecido adiposo parece responsável pela presença periférica de parte destas substâncias (Fantuzzi, 2005). Os níveis de citocinas pró-inflamatórias na corrente sanguínea apresentam correlação positiva com a adiposidade e o peso corporal, enquanto que as citocinas antiinflamatórias apresentam correlação negativa com esses parâmetros. O aumento da concentração sanguínea de citocinas pró-inflamatórias em indivíduos obesos sugere um estado de inflamação periférica. As citocinas secretadas pelo tecido adiposo, principalmente IL-1, IL-6 e TNF- $\alpha$ , são capazes de estimular a síntese hepática de proteínas de fase aguda *in vivo* e *in vitro* (Richards et al. 1991) além de estimular a ativação e aumento numérico das células inflamatórias nos linfonodos e na corrente sanguínea (Fantuzzi, 2005). Em virtude do estado pró-inflamatório mediado pelo TNF- $\alpha$ , IL-6 e proteína C reativa em indivíduos obesos, espera-se que as células mononucleares do sangue periférico estejam ativadas. No estudo de Ghanim et al. (2004), foi observado que indivíduos obesos apresentavam elevação do ligante do Fator Nuclear- $\kappa$ B em extratos nucleares ( $p < 0,05$ ) da transcrição de genes pró-inflamatórios regulados pelo NF- $\kappa$ B. Já Bulló et al. (2003) observaram relação

entre contagem leucocitária e número de desordens metabólicas associadas com a obesidade. Sugere-se que a obesidade e a resistência insulínica em humanos sejam associadas à ativação de células inflamatórias mononucleares e aumento da expressão de citocinas, embora estas células não sejam a fonte primária para elevação das citocinas inflamatórias em indivíduos obesos (Mello et al., 2008).

Os marcadores inflamatórios, em geral, podem ter sua expressão determinada em função do gênero, como descrito recentemente Thorand et al. (2005), os quais demonstraram uma interessante associação. Neste estudo foram avaliados os dados de homens e mulheres com idade entre 55-74 anos, participantes do estudo KORA Survey 2000. O Índice de Massa Corporal, a circunferência da cintura e a massa gorda, esta estimada através da impedância bioelétrica, foram associados com marcadores inflamatórios (IL-6, fibrinogênio, proteína amilóide A sérica e proteína C reativa), sendo essa associação consideravelmente mais forte em mulheres. Neste estudo, apesar da diferença na distribuição da gordura corporal entre os gêneros, sendo o maior acúmulo de tecido adiposo subcutâneo nas mulheres e de tecido adiposo intra-abdominal nos homens, a presença de hormônios sexuais poderia influenciar a maior expressão dos marcadores pró-inflamatórios nas mulheres. Assim, parece importante avaliar a relação entre adiposidade e marcadores inflamatórios, considerando o gênero, o que nem sempre é feito nos estudos.

### *2.2.2 Inflamação subclínica e resistência insulínica*

A resistência insulínica é definida como uma diminuição na capacidade da insulina em estimular a utilização de glicose, seja devido à deficiência no receptor de insulina ou mesmo por fatores como: diminuição na concentração de receptores, falha no mecanismo de trânsito celular ou defeito em algum mecanismo pós-receptor durante sua utilização (Francischi et al., 2000). Implica em uma resposta diminuída dos tecidos periféricos como músculo, fígado e tecido adiposo. Mesmo em concentrações normais, a insulina é incapaz de exercer suas funções no metabolismo de carboidratos e lipídeos, principalmente. Sua ação anabólica e anticatabólica é prejudicada, ocorrendo, assim, inibição da captação e oxidação periférica de glicose, lipólise acentuada e aumento da glicólise e gliconeogênese hepática. Não é necessariamente uma patologia, mas um estado fisiológico relacionado com o aumento de anormalidades que contribuem para a síndrome metabólica (Santos et al., 2006).

Com a resistência insulínica, as células beta do pâncreas aumentam a produção e secreção de insulina como medida compensatória, determinando no indivíduo um quadro de hiperinsulinemia. É este aumento no nível de insulina circulante, decorrente da resistência à insulina, o principal fator responsável pelas alterações encontradas na síndrome metabólica, como a hipertensão arterial, alterações no perfil lipídico, diabetes *mellitus* tipo 2 (Santos et al., 2006). Há evidências que demonstram que o aumento do nível de insulina parece preceder o desenvolvimento de um potencial fator de risco para a aterogênese, incluindo baixa concentração de HDL, trigliceridemia, e hipertensão arterial (Reaven, 2004).

A resistência insulínica pode ser decorrente de diversos fatores, sendo bastante correlacionada ao sedentarismo, genética e à obesidade, principalmente a obesidade abdominal. Entretanto, a obesidade, por si só, parece não explicar claramente o desenvolvimento de este distúrbio (Sinaiko et al., 2005). O aumento de marcadores pró-inflamatórios tem se associado com a diminuição da sensibilidade insulínica, e parece ser o elo entre a obesidade e a resistência insulínica (Shoelson et al., 2006). Algumas citocinas pró - inflamatórias favorecem o estado de resistência insulínica, agindo diretamente nos receptores de insulina, e propiciando o desenvolvimento da síndrome metabólica nestes indivíduos (Juge–Aubry et al., 2005). Segundo Chávez et al. (2006), existe uma correlação positiva entre resistência insulínica e marcadores inflamatórios, independente da idade, gênero, e outros fatores de risco para a resistência insulínica, como a obesidade, a inatividade física, tabagismo e consumo de álcool.

Desde a década de 50, a inflamação tem sido relacionada à obesidade e ao diabetes *mellitus* tipo 2 em estudos epidemiológicos. Mais tarde essa associação foi confirmada por outros estudos, e, nos dias atuais, assume-se que a obesidade é caracterizada por um estado inflamatório subclínico. O aumento da deposição de lipídios no tecido adiposo leva à redução da expressão de substâncias antiinflamatórias (adiponectina e a IL-10, principalmente) e à maior produção de inúmeros mediadores inflamatórios pelos adipócitos, como citocinas pró-inflamatórias (TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$ , resistina), quimiocinas (MCP-1) e outros mediadores pró-aterogênicos (Inibidor de Plasminogênio Ativado-1/PAI-1). (Herder et al., 2006). Além do aumento da expressão de citocinas pró-inflamatórias pelos adipócitos, ocorre o aumento da expressão de fatores de transcrição, receptores e outras proteínas, incluindo as quimiocinas, que recrutam monócitos e estimulam sua diferenciação em macrófagos. Dessa forma, os adipócitos iniciam o processo

inflamatório, e os macrófagos são responsáveis por ampliar o sinal (Shoelson et al., 2006).

Indivíduos com síndrome metabólica apresentam elevados níveis de citocinas e moléculas de adesão, indicando a presença de inflamação subclínica e, possivelmente, de disfunção endotelial nesta população (Salamenniemi et al., 2004). IL-6 e TNF- $\alpha$  são citocinas importantes, pois participam da indução e manutenção do estado pró-inflamatório subclínico associado com a obesidade (Shoelson et al., 2006). Herder et al. (2006) verificaram que indivíduos que possuíam elevadas concentrações de MCP-1 e IL-8 apresentavam maior risco de desenvolver diabetes *mellitus* tipo 2. No estudo de Kern et al. (2001), IL-6 apresentou forte associação com a resistência insulínica, de modo que indivíduos com baixa sensibilidade insulínica tinham 2,3 vezes mais IL-6 plasmática que aqueles com maior sensibilidade insulínica. Por outro lado, o estudo de Exel et al. (2002) demonstrou que a elevada expressão de IL-10 no sangue periférico poderia ser um fator protetor ao desenvolvimento de diabetes mellitus tipo 2.

Em uma amostra composta por índios PIMA (uma população de índios conhecida pela alta prevalência de obesidade e diabetes “mellitus” tipo 2) sem diabetes, com idade entre 18 e 43 anos, a concentração plasmática de IL-6 de jejum se correlacionou positivamente com a gordura corporal avaliada ( $r = 0,26$ ;  $p = 0,049$ ), por meio do DEXA, e negativamente com a atividade da insulina ( $r = -0,28$ ;  $p = 0,031$ ), avaliado pelo clamp euglicêmico hiperinsulinêmico (Vozarova et al., 2001). Entretanto, após ajustado para a gordura corporal, IL-6 não se correlacionou com a atividade da insulina ( $r = -0,23$ ;  $p = 0,089$ ).

O mecanismo pelo qual as citocinas pró-inflamatórias levam à resistência insulínica parece envolver a diminuição da sinalização dos receptores de insulina e conseqüente hiperinsulinemia (Sinaiko et al., 2005; Shoelson et al., 2006). Segundo Chávez et al. (2006), em indivíduos com síndrome metabólica parece ocorrer um estado de retroalimentação positiva entre a inflamação e resistência insulínica. Como a insulina é um inibidor da síntese de proteínas de fase aguda, a presença de resistência insulínica proporcionaria um aumento da resposta inflamatória, e o aumento de citocinas contribuiria para o aumento da resistência insulínica nos tecidos periféricos e maior produção de insulina.

### 2.3 Inflamação subclínica em adolescentes

Estudos mostrando a influência da composição corporal na expressão de marcadores inflamatórios em adolescentes são escassos. Na maioria das vezes, as pesquisas associam a presença de marcadores inflamatórios com parâmetros antropométricos, sem considerar a composição corporal desta população. A maioria dos estudos é conduzida com indivíduos com sobrepeso, por meio da utilização de indicadores que avaliam a adequação do peso em relação à altura, gênero e idade, como o IMC. Desse modo, estima-se que aqueles indivíduos que apresentam elevado peso em relação às demais variáveis também possuem elevado percentual de gordura, o que nem sempre é verdadeiro, já que o peso corporal é influenciado pelos componentes corporais, como ossos, músculos e tecido adiposo. Kelly et al. (2004) avaliaram 25 crianças e adolescentes pré-púberes, e encontrou associação entre marcadores inflamatórios e IMC, entretanto, nenhuma medida de composição corporal foi empregada.

O estudo Visser et al. (2001) avaliou os dados de 3512 crianças e adolescentes de 8 a 16 anos de idade do third National Health and Nutrition Survey – NHANES III (1988-1994) e encontraram associação entre proteína C reativa e IMC e gordura corporal, este último parâmetro avaliado por meio da aferição de três pregas cutâneas (tricipital, subescapular e suprailíaca). Segundo este estudo, a utilização de parâmetros que avaliem a composição corporal pode ser eficaz, uma vez que o tecido adiposo é o principal componente associado com a expressão de marcadores da inflamação. É importante ressaltar que este estudo utilizou pregas cutâneas para avaliação da composição corporal, sendo estas representativas, principalmente, do conteúdo de tecido adiposo subcutâneo. Desse modo seria necessária a utilização de métodos que considerem o conteúdo total de gordura corporal, como a utilização da impedância bioelétrica.

Em adolescentes indianos do gênero masculino, não foi encontrada correlação entre inflamação subclínica, avaliada pelos níveis de proteína C reativa sérica, e insulinemia de jejum e resistência insulínica (Vikram et al., 2006). No entanto, estes autores não avaliaram tal relação em adolescentes do gênero feminino, sendo possível que a existência de padrões de inflamação distintos segundo o gênero avaliado.

Estudando 71 adolescentes de 15 a 16 anos de idade, Moon et al. (2004) demonstraram que TNF- $\alpha$  sérico e seus receptores séricos, R1 e R2, eram

significativamente maiores em adolescentes obesos que naqueles não-obesos. Além disso, foi verificada diferença nos níveis séricos de acordo com gênero, sendo que meninos apresentavam níveis mais elevados que meninas. Neste mesmo estudo (Moon et al., 2004), foi verificada relação entre inflamação subclínica e os componentes da síndrome metabólica nos adolescentes avaliados (obesos e não obesos, juntos). O TNF- $\alpha$  sérico se correlacionou positivamente com os níveis de triglicerídeos e a pressão arterial diastólica. Os receptores séricos R1 e R2 do TNF- $\alpha$  correlacionaram-se com triglicerídeos e a pressão arterial diastólica, e triglicerídeos, respectivamente. No grupo de adolescentes obesos, o TNF- $\alpha$  sérico se correlacionou com triglicerídeos e a pressão arterial diastólica, não sendo encontrada correlação entre esta citocina e colesterol total, HDL, glicemia de jejum e pressão arterial diastólica. Entretanto, o receptor R1 se correlacionou com triglicerídeos, pressão arterial diastólica e pressão arterial sistólica, e o receptor R2 se correlacionou com triglicerídeos no grupo de adolescentes obesos.

Em estudo de abrangência nacional nos Estados Unidos, Ferranti et al. (2006) avaliaram a relação entre anormalidades metabólicas e concentração plasmática de proteína C reativa, utilizando dados do NHANES de 1988-1994 e de 1999-2000. Adolescentes com anormalidades metabólicas apresentavam maior concentração plasmática de proteína C reativa, o qual, segundo os autores, poderia ser utilizado como um bom indicador de anormalidades metabólicas e de risco cardiovascular futuro.

É importante ressaltar que, apesar de ser associada ao maior risco de desenvolvimento de doenças ateroscleróticas, a utilização da proteína C reativa tem sido questionada devido à existência de inúmeras limitações em relação a este parâmetro. Primeiro, porque este marcador possui uma meia vida curta, podendo não refletir o estado de inflamação crônica. Segundo, por ser muito sensível e apresentar variações biológicas na ordem de 10,6% a 63% (Sites et al., 2002).

Espera-se que mais estudos sejam realizados com esta população em especial, a fim de se verificar o perfil de inflamação em adolescentes com excesso de gordura corporal.

## **2.4 Inflamação Subclínica em indivíduos com peso normal e elevada gordura corporal**

A obesidade é caracterizada como o excesso de gordura corporal, sendo assim, torna-se importante a estimativa da composição corporal para determinação da presença ou ausência da obesidade. Como os métodos para estimativa da gordura corporal não são aplicados aos estudos populacionais, a obesidade é comumente diagnosticada tendo como base o aumento do peso corporal em relação à estatura (Ruderman et al., 1981; Kuczmarski et al., 2000). O Índice de Massa Corporal (IMC), ou Índice de Quetelet, que corresponde ao peso dividido pela altura ao quadrado ( $\text{kg/m}^2$ ), tem sido o indicador mais utilizado em estudos populacionais para triagem do excesso de peso corporal em adultos e adolescentes (Monteiro et al., 2000). É um indicador que possui grande precisão e boa correlação com os parâmetros de avaliação da adiposidade e com as complicações do sobrepeso como hipercolesterolemia e hipertensão na adolescência e desenvolvimento futuro de doenças cardiovasculares (Albano e Souza, 2001; Baker et al., 2005). Para adultos, os limites mínimos e máximos aceitáveis são baseados em estudos de mortalidade. Em adolescentes tais limites são bastantes discutidos, uma vez que a incidência de morbidades e mortalidade nesta fase é considerada baixa (Abrantes et al., 2003). Em geral, os pontos de corte para adolescentes são baseados no aumento do risco de desenvolvimento de sobrepeso e obesidade na idade adulta, e, conseqüentemente, no maior risco de mortalidade futura (Demerath et al., 2006). O estudo de Engeland et al. (2003) demonstrou que a taxa de mortalidade de adultos era maior naqueles que apresentavam maiores percentis de IMC durante a adolescência. No entanto, apesar de o IMC ser fortemente correlacionado com a adiposidade, sua utilização pode ser limitada, já que este índice não distingue os compartimentos corporais. As comorbidades associadas à obesidade são relacionadas à elevada deposição de gordura corporal, e não ao aumento de peso por si só (Ruderman et al., 1981).

No estudo de Chiara et al. (2003), foi avaliada a sensibilidade e especificidade do IMC em detectar adolescentes em risco de obesidade, considerando a prega cutânea subescapular como “padrão-ouro”. Para tal, foram utilizados dados de 502 adolescentes de 12 a 18 anos, participantes da pesquisa Nutrição e Saúde do município do Rio de Janeiro, desenvolvida em 1996. Foi observado que o IMC apresentava especificidade superior à sensibilidade, sendo o ponto de equilíbrio entre sensibilidade e especificidade próximo ao percentil 70 para meninas e para os

meninos menores de 14 anos, e próximo do percentil 50 para meninos maiores de 15 anos. Os resultados deste estudo sugerem que o IMC não é adequado para rastrear excesso de adiposidade, sendo necessária uma classificação de maior sensibilidade, especialmente no final da adolescência. Sendo assim, a avaliação da composição corporal pode ser mais eficaz no diagnóstico de obesidade, que a utilização de critérios que utilizem apenas parâmetros como peso e estatura (Diretrizes Brasileiras de Obesidade, 2007).

Em 1981 uma condição chamou a atenção de especialistas: indivíduos de peso normal, mas com excesso de gordura corporal. Ruderman et al. (1981) afirmaram que estes indivíduos eram considerados obesos, mas sua obesidade não era revelada por parâmetros utilizados usualmente, os quais não distinguem a composição corporal, como o peso e a estatura. Estes indivíduos eram metabolicamente semelhantes aos obesos, uma vez que apresentavam redução na tolerância à glicose, resistência insulínica e maior prevalência de dislipidemias e hipertensão arterial, quando comparados com indivíduos eutróficos. Segundo De Lorenzo et al. (2006), indivíduos com peso normal mas gordura corporal elevada, ou “obesos de peso normal”, apresentam risco aumentado de desenvolvimento de doenças ateroscleróticas, quando comparados com indivíduos com peso e percentual de gordura normais.

A presença de inflamação subclínica nestes indivíduos tem sido recentemente estudada. Suspeitava-se que indivíduos metabolicamente obesos, à semelhança daqueles obesos, apresentavam ativação do sistema imune inato, em decorrência do aumento da área de tecido adiposo, e, conseqüentemente, maior produção de citocinas e ativação periférica de células mononucleares inflamatórias.

De Lorenzo et al. (2007), avaliaram o perfil de inflamação de 60 mulheres de 20 a 35 anos, divididas em três grupos: metabolicamente obesos de peso normal, obesos e eutróficos. Neste estudo, as concentrações plasmáticas de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-8 foram significativamente maiores nos grupos com mulheres obesas e metabolicamente obesas de peso normal. Não foram encontradas diferenças entre as concentrações de IL-10 nos grupos dois grupos estudados. Isto sugere a semelhança metabólica e perfil inflamatório entre os grupos de interesse, em decorrência da elevada gordura corporal destes indivíduos. Entretanto, outros autores afirmam que indivíduos obesos de peso normal parecem apresentar risco intermediário de desenvolvimento de doenças cardiovasculares, quando comparados à indivíduos eutróficos e com sobrepeso (Karelis et al., 2005). Isto porque, apesar de

os estudos trabalhem com indivíduos obesos e metabolicamente obesos de peso normal que não diferem em relação ao percentual de gordura corporal, a massa de tecido adiposo (em kg) tende a ser maior nos indivíduos obesos.

Karelis et al. (2005), avaliaram as características metabólicas de mulheres pós-menopausa obesas de peso normal e sensíveis à insulina. Verificou-se que estas apresentaram menores concentrações de proteína C reativa de alta sensibilidade, triglicerídeos plasmáticos e gordura de acúmulo visceral, além de baixa concentração plasmática de HDL, quando comparado às mulheres com resistência insulínica.

Inicialmente, estimava-se que o excesso de gordura corporal em indivíduos de peso normal era presente apenas em indivíduos mais velhos, de meia-idade. No entanto, atualmente verifica-se indivíduos jovens que apresentam excesso de gordura corporal, embora permaneçam com peso adequado para a sua estatura (Chiara et al, 2003). Em geral, esta condição tem sido estudada especialmente em adultos. Poucos estudos avaliaram a real contribuição do tecido adiposo no processo de inflamação subclínica em crianças e adolescentes, principalmente naqueles metabolicamente obesos de peso normal. São necessários estudos que avaliem as alterações metabólicas e no perfil de inflamação em crianças e adolescentes, visto a tendência de aumento nos casos de obesidade nesta população e a baixa sensibilidade do IMC no diagnóstico de obesidade (Vieira et al., 2006).

## **2.5 Considerações Finais**

Conforme discutido, a inflamação subclínica constitui importante alteração evidenciada em indivíduos com excesso de gordura corporal, sejam obesos ou “metabolicamente obesos de peso normal”. O aumento de citocinas pró-inflamatórias propicia o desenvolvimento de resistência insulínica e aterosclerose, caracterizando-se como importante distúrbio na atualidade.

Os trabalhos neste tema são recentes, e há escassez no estudo com populações jovens, como crianças e adolescentes. Faz-se necessária maior compreensão acerca do papel do tecido adiposo e da inflamação subclínica no desenvolvimento de doenças cardiovasculares, em especial, em crianças e adolescentes. Trabalhar com indivíduos jovens significa prevenir e tratar precocemente distúrbios antes encontrados apenas em adultos.

## Referências Bibliográficas

Abrantes MM, Lamounier JA, Colosimo EA. Comparison of body mass index values proposed by Cole et al. (2000) and Must et al. (1991) for identifying obese children with weight-for-height index recommended by the World Health Organization. *Public Health Nutr* 2003, 6(3):307-11.

Albano RD, Souza SB. Estado nutricional de adolescentes: “risco de sobrepeso” e “sobrepeso” em uma escola pública do Município de São Paulo. *Cad Saúde Pública* 2001, 17(4):941-7.

Atualização Brasileira sobre Diabetes. SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES. Rio de Janeiro: Diagraphic, 2006.

Baker S, Barlow S, Cochran W, Fuchs G, Klish W, Krebs N, Strauss R, Tershakovec A, Udall J. Overweight children and adolescents: A clinical report of the North American Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2005, 40(5):533-43.

Berg AH, Lin Y, Lisanti MP, Scherer PE. Adipocyte differentiation induces dynamic changes in NF- $\kappa$ B expression and activity. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2004, 287(6):E1178-88.

Brandão AA, Magalhães MEC, França MF, Pozzan R, Brandão AP. Síndrome metabólica em crianças e adolescentes. *Rev Bras Hipertens* 2005, 12(3):169-77.

Bruun JM, Helge JW, Richelsen B, Stallknecht B. Diet and exercise reduce low-grade inflammation and macrophage infiltration in adipose tissue but not in skeletal muscle in severe obese subjects. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2006, 290(5):E961-7.

Bruun JM, Lihn AS, Madan AK, Pedersen SB, Schiott KM, Fain JN, Richelsen B. Higher production of IL-8 in visceral vs. subcutaneous adipose tissue. Implication of nonadipose cells in adipose tissue. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2004, 286(1):E8-13.

Bulló M, García-Lorda P, Megias I, Salas-Salvadó. Systemic inflammation, adipose tissue tumor necrosis factor, and leptin expression. *Obes Res* 2003, 11(4):525-31.

Bulló M, García-Lorda P, Peinado-Onsurbe J, Hernández M, Del Castillo D, Argilés JM, Salas-Salvadó J. TNF $\alpha$  expression of subcutaneous adipose tissue in obese and morbid obese females: relationship to adipocyte LPL activity and leptin synthesis. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2002, 26(5):652-8.

Chávez AG, Hernandez LMM, Zúñiga MJS, Argueta SE, Zarza JEN, Rodríguez ZSR. Inflamación y resistencia a la insulina: Mecanismos para el desarrollo de la disfunción endotelial y aterosclerosis. *Rev Mex Cardiol* 2006, 17(2):71-82.

Chiara V, Sichieri R, Martins PD. Sensibilidade e especificidade de classificação de sobrepeso em adolescentes, Rio de Janeiro. *Rev Saúde Pública* 2003, 37(2):226-31.

- Cook S, Auinger P, Li C, Ford ES. Metabolic syndrome rates in United States adolescents, from the National Health and Nutrition Examination Survey, 1999-2002. *J Pediatr* 2008, 152(2):165-70.
- Cook S, Weitzman M, Auinger P, Nguyen M, Dietz WH. Prevalence of a metabolic syndrome phenotype in adolescents. Findings from the National Health and Nutrition Examination Survey, 1988-1994. *Arch Pediatr Adolesc Med* 2003, 157(8):821-7.
- Curat CA, Miranville A, Sengenès C, Dichl M, Tônus C, Busse R, Bouloumiè A. From blood monocytes to adipose tissue-resident macrophages. Induction of diapedesis by human mature adipocytes. *Diabetes* 2004, 53(5):1285-92.
- Daniels SR, Arnett DK, Eckel RH, Gidding SS, Hayman LL, Kumanyika S, Robinson TN, Scott BJ, Jeor SS, Williams CL. Overweight in children and adolescents. Pathophysiology, consequences, prevention, and treatment. *Circulation* 2005, 111(15):1999 – 2012.
- De Lorenzo A, Del Gobbo V, Premrov MG, Bigioni M, Galvano F, Di Renzo L. Normal-weight obese syndrome: early inflammation? *Am J Clin Nutr* 2007, 85(1):40-5.
- De Lorenzo A, Martinoli R, Vaia F, Di Renzo L. Normal weight obese (NWO) women: An evaluation of a candidate new syndrome. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2006, 16(8):513-23.
- Demerath, E.W., Schubert, C.M.; Maynard, L.M.; Sun, S.S.; Chumlea, W.C.; Pickoff, A.; Czerwinski, S.A.; Towne, B.; Siervogel, R.M. Do changes in body mass index percentile reflect changes in body composition in children? Data from the Fels Longitudinal Study. *Pediatrics* 2006, 117(3):e487-95.
- Diretrizes Brasileiras de Obesidade. Associação Brasileira para o Estudo da Obesidade e da Síndrome Metabólica 2007.
- Dunger DB, Ahmed ML, Ong KK. Effects of obesity on growth and puberty. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2005, 19(3):375-90.
- Engeland A, Bjørge T, Sjøgaard AJ, Tverdal A. Body mass index in adolescence in relation to total mortality: 32-year follow-up of 227,000 Norwegian boys and girls. *Am J Epidemiol* 2003, 157(6):517-23.
- Exel EV, Gusseklo J, Craen AJ, Frölich M, Bootsma-Van Der Wiel A, Westerdorp RG. Low production capacity of interleukin-10 associates with the metabolic syndrome and type 2 diabetes: the Leiden 85-Plus Study. *Diabetes* 2002, 51(4):1088-92.
- Fantuzzi G. Adipose tissue, adipokines, and inflammation. *J Allergy Clin Immunol* 2005, 115(5):911-9.
- Ferranti SD, Gauvreau K, Ludwig DS, Newburger JW, Rifai N. Inflammation and changes in metabolic syndrome in US adolescents: findings from the 1988-1994 and 1999-2000 National Health and Nutrition Surveys. *Clin Chem* 2006, 52(7):1325-30.

- Festa A, D'Agostino RJ, Williams K, Karter AJ, Mayer-Davis EJ, Tracy RP, Haffner SM. The relation of body fat mass and distribution to markers of chronic inflammation. *Int J Obes* 2001, 25(10):1407-15.
- Filho FFR, Moriosa LS, Ferreira SRG, Zanella MT. Gordura Visceral e Síndrome Metabólica: Mais Que Uma Simples Associação. *Arq Bras Endocrinol Metab* 2006, 50(2):230-8.
- Francischi RPP, Pereira LO, Freitas CS, Klopfer M, Santos RC, Vieira P, Lancha Jr AH. Obesidade: atualização sobre sua etiologia, morbidade e tratamento. *Rev Nutr* 2000, 13(1):17-29.
- Frankenberger M, Pforte A, Sternsdorf T, Passlick B, Baeuerle PA, Ziegler-Heitbrock. Constitutive nuclear NF-KB in cells of the monocyte lineage. *Biochem J* 1994; 304(Pt 1):87-94.
- Frutuoso MFP, Bismarck-Nars EM, Gambardella AMD. Redução do dispêndio energético e excesso de peso corporal em adolescentes. *Rev Nutr* 2003, 16(3):257-63.
- Garcia GCB, Gambardella AMD, Frutuoso MFP. Estado nutricional e consumo alimentar de adolescentes de um centro de juventude da cidade de São Paulo. *Rev Nutr* 2003, 16(1):41-50.
- Gaya AR, Cardoso M, Gaya A, Santos P, Oliveira J, Ribeiro J, Duarte J, Mota J. Efeitos da maturação sexual nos níveis de pressão arterial em crianças e adolescentes do sexo masculino: associação com as variáveis massa corporal, estatura e idade cronológica. *Rev Bras Educ Fís ESP* 2005, 19(3):199-207.
- Ghanim H, Aljada A, Hofmeyer D, Syed T, Mohanty P, Dandona P. Circulating mononuclear cells in the obese are in a proinflammatory state. *Circulation* 2004, 110(12):1564-71.
- Gilardini L, McTernan PG, Girola A, Silva NF, Alberti L, Kumar S, Invitti C. Adiponectin is a candidate marker of metabolic syndrome in obese children and adolescents. *Atherosclerosis* 2006, 189(2):401-7.
- Herder C, Baumert J, Thorand B, Koenig W, Jager W, Meisinger C, Illig T, Martin S, Kolb H. Chemokines as risk factors for type 2 diabetes: results from the MONICA/KORA Augsburg study, 1984-2002. *Diabetologia* 2006, 49(5):921-9.
- Hermsdorff HHM, Monteiro JBR. Gordura Visceral, Subcutânea ou Intramuscular: Onde Está o Problema? *Arq Bras Endocrinol Metab* 2004, 48(6):803-11.
- Huang M-T, Ghai G, Ho C-T. Inflammatory process and molecular targets for anti-inflammatory nutraceuticals. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 2004, 3(4):127-39.
- I Diretriz Brasileira de Diagnóstico e Tratamento da Síndrome Metabólica. *Arq Bras Cardiol* 2005, 84 (supl. 1).

- Iuliano BA, Frutuoso MFP, Gambardella AMD. Anemia em adolescentes segundo maturação sexual. *Rev Nutr* 2004, 17(3):37-43, 2004.
- Juge-Aubry CE, Henrichot E, Meier CA. Adipose Tissue: a regulator of inflammation. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2005, 19(4):547-66.
- Kapiotis S, Holzer G, Schaller G, Haumer M, Widhalm H, Weghuber D, Jilma B, Röggl G, Wolzt M, Widhalm K, Wagner OF. A proinflammatory state is detectable in obese children and is accompanied by functional and morphological vascular changes. *Arterioscler Tromb Vasc Biol* 2006, 26(11):2541-6.
- Karelis AD, Faraj M, Bastard J-P, St-Pierre DH, Brochu M, Prud'homme D, Rabasa-Lhoret R. The metabolically healthy but obese individual presents a favorable inflammation profile. *J Clin Endocrinol Metab* 2005, 90(7):4145–4150.
- Katona E, Settakis G, Varga Z, Paragh G, Bereczki D, Fülesdi B, Páll D. Target-organ damage in adolescents hypertension. Analysis of potential influencing factors, especially nitric oxide and endothelin-1. *J Neurol Sci* 2006, 247(2):138-43.
- Kelishadi R, Gheiratmand R, Ardalan G, Adeli K, Gouya MM, Razaghi EM, Majdzadeh R, Delavari A, Shariatinejad K, Motaghian M, Heshmat R, Heidarzadeh A, Barekati H, Mahmoud-Arabi MS, Riazi MM. Association of anthropometric indices with cardiovascular disease risk factors among children and adolescents: CASPIAN Study. *Intern J Cardiol* 2006, 117(3):429-35.
- Kelly AS, Wetzsteon RJ, Kaiser DR, Steinberger J, Bank AJ, Dengel DR. Inflammation, insulin and endothelial function in overweight children and adolescents: the role of exercise. *J Pediatr* 2004, 145(6):731-6.
- Kern PA, Ranganathan S, Li C, Wood L, Ranganathan G. Adipose tissue tumor necrosis factor and interleukin-6 expression in human obesity and insulin resistance. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2001, 280(5):E745-51.
- Koletzko B, Girardet J-P, Klish W, Tabacco O. Obesity in children and adolescents worldwide: current views and future directions – Working group report of the First World Congress of Pediatric Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2002, 35(Suppl 2):S205-12.
- Kuczmarski RJ, Ogden CL, Grummer-Strawn LM, Flegal KM, Guo SS, Wei R. CDC growth charts: United States. *Adv Data* 2000, 8(314):1-27.
- Lau DCW, Dhillon B, Yan H, Szmitko PE, Verma S. Adipokines: molecular links between obesity and atherosclerosis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2005, 288(5):H2031-41.
- Lee JM, Okumura MJ, Davis MM, Herman WH, Gurney JG. Prevalence and determinants of insulin resistance among U.S. adolescents. *Diabetes Care* 2006, 29(11):2427-32.
- Manigrasso MR, Ferroni P, Santilli F, Taraborelli T, Guagnano MT, Michetti N, Davì G. Association between circulating adiponectin and interleukin-10 levels in

android obesity: effects of weight loss. *J Clin Endocrinol Metab* 2005, 90(10):5876-9.

Mascarenhas LPG, Salgeirosa FM, Nunes GF, Martins PA, Stabelini-Neto A, Campos W. Relação entre diferentes índices de atividade física e preditores de adiposidade em adolescentes de ambos os sexos. *Rev Bras Med Esporte* 2005, 11(4):214-8.

Mello VDF, Kolehmainen M, Schwab U, Mager U, Laaksonen DE, Pulkkinen L, Niskanen L, Gylling H, Atalay M, Rauramaa R, Uusitupa M. Effect of weight loss on cytokine messenger RNA expression in peripheral blood mononuclear cells of obese subjects with the metabolic syndrome. *Metabolism* 2008, 57(2):192-9.

Monteiro POA, Victora CG, Barros FC, Tomasi E. Diagnóstico de sobrepeso em adolescentes: estudo do desempenho de diferentes critérios para o Índice de Massa Corporal. *Rev Saúde Pública* 2000, 34(5):506-13.

Moon Y-S, Kim D-H, Song D-K. Serum Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  levels and components of the metabolic syndrome in obese adolescents. *Metabolism* 2004, 53(7):863-7.

Moreira DM, Fragoso MIJ, Oliveira Jr AV. Níveis maturacional e socioeconômico de jovens sambistas do Rio de Janeiro. *Rev Bras Med Esporte* 2004, 10(1):16-23.

NCEP. Executive summary of the third report of National Cholesterol Education Program (NCEP) expert panel on detection, evaluation, and treatment of high blood cholesterol in adults (Adult Treatment Panel III). *JAMA* 2001, 285(19):2486-97.

Oehlschlaeger MHK, Pinheiro RT, Horta B, Gelatti C, San'Tana P. Prevalência e fatores associados ao sedentarismo em adolescentes de área urbana. *Rev Saúde Pública* 2004, 38(2):157-63.

Oliveira CL, Mello MT, Cintra IP, Fisberg M. Obesidade e síndrome metabólica na infância. *Rev Nutr* 2004, 17(2):237-45.

Oliveira CS, Veiga GV. Estado nutricional e maturação sexual de adolescentes de uma escola pública e de uma escola privada do Município do Rio de Janeiro. *Rev Nutr* 2005, 18(2):183-191.

Pascieri V, Willerson JT, Yeh ETH. Direct proinflammatory of C-reactive protein on human endothelial cells. *Circulation* 2000, 102(18):2165-8.

Reaven GM. Insulin resistance, cardiovascular disease, and the metabolic syndrome. How well do the emperor's clothes fit? *Diabetes Care* 2004, 27(4):1011-2.

Richards C, Gauldie J, Baumann H. Cytokine control of acute phase protein expression. *Eur Cytokine Netw* 1991, 2(2):89-98.

Rodríguez G, Moreno LA, Blay MG, Blay VA, Garagorri JM, Sarría A, Buen M. Body composition in adolescents: measurements and metabolic aspects. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2004, 28(Suppl 3):S54-8.

Ruderman NB, Schneider SH, Berchtold P. The “metabolically-obese,” normal-weight individual. *Am J Clin Nutr* 1981, 34(8):1617-1621.

Salmenniemi U, Ruotsalainen E, Pihlajamäki J, Vaukonen I, Kainulainen S, Punnonen K, Vanninen E, Laakso M. Multiple abnormalities in glucose and energy metabolism and coordinated changes in levels of adiponectin, cytokines, and adhesion molecules in subjects with metabolic syndrome. *Circulation* 2004, 110(25):3842-8.

Santos CRB, Portella ES, Ávila SS, Soares EA. Fatores dietéticos na prevenção e tratamento de comorbidades associadas à síndrome metabólica. *Rev Nutr* 2006, 19(3):389-401.

Shoelson SE, Lee J, Goldfine AB. Inflammation and insulin resistance. *J Clin Invest* 2006, 116(7):1793-801.

Silva RCR, Malina RM. Nível de atividade física em adolescentes do município de Niterói, Rio de Janeiro, Brasil. *Cad Saúde Pública* 2000, 16(4):1091-7.

Sinaiko AR, Steinberger J, Moran A, Prineas RJ, Vessby B, Basu S, Tracy R, Jacobs DR. Relation of body mass index and insulin resistance to cardiovascular risk factors, inflammatory factors, and oxidative stress during adolescence. *Circulation* 2005, 111(15):1985-91.

Sites CK, Toth MJ, Cushman M, Hommedieu GDL, Tchernof A, Tracy RP, Poehman ET. Menopause-related differences in inflammation markers and their relationship to body fat distribution and insulin-stimulated glucose disposal. *Fertil and Steril* 2002, 77(1):128-35.

Sookoian S, García SI, Gianotti TF, Dieuzeide G, González CD, Pirola CJ. The G-308A promoter variant of the tumor necrosis factor- $\alpha$  gene is associated with hypertension in adolescents harboring the metabolic syndrome. *Am J Hypertens* 2005, 18(10):1271-5.

Steinberger J, Steffen L, Jacobs JR, DR, Moran A, Hong CP, Sinaiko AR. Relation of leptin to insulin resistance syndrome in children. *Obesity Research* 2003, 11(9):1124-30.

Tak PP, Firestein GS. NF- $\kappa$ B: a key role in inflammatory diseases. *J Clin Invest* 2001, 107(1):7-11.

Thorand B, Baumert J, Döring A, Herder C, Kolb H, Rathmann W, Giani G, Koenig W, for the KORA Group. Sex differences in the relation of body composition to markers of inflammation. *Atherosclerosis* 2006, 184(1):216-4.

Trayhurn P. Adipose tissue in obesity – An inflammation issue. *Endocrinology* 2005, 146(3):1003-5.

Valle M, Gascón F, Martos R, Ruz FJ, Bermudo F, Morales R, Cañete R. Metabolic Cardiovascular Syndrome in obese prepubertal children: The role of high fasting insulin levels. *Metabolism* 2002, 51(4):423-8.

- Vieira VCR, Priore SE, Ribeiro SMR, Franceschini SCC, Almeida LP. Perfil socioeconômico, nutricional e de saúde de adolescentes recém-ingressos em uma universidade pública brasileira. *Rev Nutr* 2002, 15(3):273-2.
- Vieira ACR, Alvarez MM, Marins VMR, Sichieri R, Veiga GV. Desempenho de pontos de corte do índice de massa corporal de diferentes referências na predição de gordura corporal em adolescentes. *Cad Saúde Pública* 2006, 22(8):1681-90.
- Vikram NK, Misra A, Pandey RM, Dwivedi M, Luthra K, Dhingra V, Talwar KK. Association between subclinical inflammation & fasting insulin in urban young adult north Indian males. *Indian J Med Res* 2006, 124(6):677-82.
- Visser M, Bouter LM, McQuillan GM, Wener MH, Harris TB. Elevated C-reactive protein levels in overweight and obese adults. *JAMA* 1999, 282(22):2131-5.
- Visser M, Bouter LM, McQuillan GM, Wener MH, Harris TB. Low-Grade Systemic Inflammation in Overweight Children. *Pediatrics* 2001, 107(1):1-6.
- Vitalle MSS, Tomioka CY, Juliano Y, Amancio OMS. Índice de massa corporal, desenvolvimento puberal e sua relação com a menarca. *Rev Ass Bras Med* 2003, 49(4):429-33.
- Vitolo MR. *Nutrição da gestação à adolescência*. Rio de Janeiro: Reichmann & Affonso editores, 2003.
- Vojarova B, Weyer C, Hanson K, Tataranni PA, Bogardus C, Pratley RE. Circulating interleukin-6 in relation to adiposity, insulin action, and insulin secretion. *Obes Res* 2001, 9(7):414-7.
- Wang B, Jenkins JR, Trayhurn P. Expression and secretion of inflammation-related adipokines by human adipocytes differentiated in culture: integrated response to TNF $\alpha$ . *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2005; 288(4):E731-40.
- Weisberg SP, McCann D, Desai M, Rosenbaum M, Leibel RL, Ferrante-Jr AW. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J Clin Invest* 2003, 112(12):1796-808.
- WHO. World Health Organization. Obesity. Preventing and Managing the global epidemic. Report of a WHO consultation on obesity. Geneva: World Health Organization; 1998.

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 Geral**

Avaliar a expressão periférica de TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-10 em adolescentes do gênero feminino pós-púberes com sobrepeso, nas “metabolicamente obesas de peso normal”, e nas com sobrepeso resistentes à insulina, bem como avaliar a correlação entre a expressão destes mediadores e os parâmetros relacionados com a síndrome metabólica.

#### **3.2 Específicos**

- Avaliar os parâmetros antropométricos e de composição corporal dos grupos estudados.
- Verificar o perfil metabólico das adolescentes com sobrepeso, nas “metabolicamente obesas de peso normal”, e nas com sobrepeso resistentes à insulina, considerando os parâmetros relacionados com a síndrome metabólica.
- Avaliar a expressão periférica de TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-10 em adolescentes do gênero feminino pós-púberes com sobrepeso e naquelas “metabolicamente obesas de peso normal”.
- Avaliar a expressão periférica de TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-10 em adolescentes do gênero feminino pós-púberes com sobrepeso resistentes à insulina.
- Verificar a relação entre a expressão periférica de TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-10 e os parâmetros da síndrome metabólica nas adolescentes com sobrepeso, nas “metabolicamente obesas de peso normal”, e nas com sobrepeso resistentes à insulina.

## 4 METODOLOGIA

### 4.1 Delineamento do estudo

Tratou-se de estudo epidemiológico, transversal, tendo como unidade de estudo o indivíduo.

### 4.2 Casuística

Foram selecionadas 72 adolescentes do gênero feminino, pós-puberes, com idade entre 14 e 17 anos, estudantes de escolas públicas de Viçosa – MG.

#### 4.2.1 Critérios de inclusão

As estudantes selecionadas cursavam o ensino médio em escolas da rede pública de ensino do município de Viçosa – MG, e possuíam idade mínima de 14 anos e máxima de 17 anos. Em relação às características biológicas, apresentaram menarca há pelo menos 1 ano. A escolha de meninas que já tenham apresentado a menarca é devido ao fato do estágio de maturação sexual estar relacionado com a composição corporal, e a presença da menarca caracterizar o estágio maturacional próximo ao final (Vitalle et al., 2003).

Para composição de cada grupo de estudo, foram selecionadas 24 adolescentes em função das características antropométricas e de composição corporal:

- Grupo controle (G1): adolescentes que apresentavam Índice de Massa Corporal (IMC) entre os valores de percentil de 25 e 85 segundo idade e gênero de acordo com as curvas do *Center for Disease Control and Prevention – National Center for Health Statistics (CDC/NCHS)* de 2000 (Kuczmarski et al., 2000), e percentual de gordura corporal total entre 20% e 25%, de acordo com Lohman (1992). Tratava-se de um grupo composto por apenas adolescentes eutróficas.
- “Metabolicamente obesas de peso normal” (G2): adolescentes que apresentavam IMC entre os valores de percentil de 25 e 85 segundo idade e gênero de acordo com as curvas do CDC/NCHS de 2000 (Kuczmarski et al., 2000) e percentual de gordura corporal total  $\geq 28\%$ . Dessa forma, as

adolescentes eram eutróficas segundo o IMC, porém apresentavam gordura corporal elevada.

- Grupo Sobrepeso (G3): adolescentes que apresentavam IMC acima do percentil 85 segundo idade e gênero, de acordo com as curvas do CDC/NCHS de 2000 (Kuczmarski et al., 2000) e percentual de gordura corporal total  $\geq$  28%. Neste grupo, as adolescentes apresentavam peso e gordura corporal elevados.

#### 4.2.2 Critérios de exclusão

Utilizou-se como critério de exclusão a utilização de medicamentos ou a presença de doenças que interferiam na expressão de marcadores inflamatórios, na pressão arterial, no perfil lipídico e/ou metabolismo glicídico, bem como aquelas que estavam em período gestacional. Também foram excluídas pacientes que apresentaram valores de proteína C reativa  $>10$  mg/L, sendo este valor caracterizado como presença de possível processo inflamatório ou infecção, o que poderia afetar os resultados referentes à expressão de mRNA de marcadores inflamatórios (Pearson et al., 2003). Assim, procurou-se garantir a homogeneidade da amostra, bem como diminuir as interferências na avaliação bioquímica, clínica e de composição corporal.

### 4.3 Materiais e métodos

#### 4.3.1 Seleção da amostra

Foram convidadas a participar do estudo adolescentes do gênero feminino de escolas públicas da cidade de Viçosa-MG, sendo então observados os critérios de inclusão e exclusão do estudo.

Inicialmente foi realizada uma triagem nas escolas, por meio da aferição do peso e da estatura para determinação do IMC, bem como da avaliação da composição corporal pela utilização da impedância bipedal. Essa triagem foi realizada individualmente, em uma sala ou local próprio para este fim dentro das escolas. As adolescentes que se adequaram aos critérios tiveram agendadas consultas individuais, de modo que fosse possível a avaliação da gordura corporal pela bioimpedância elétrica tetrapolar.

Os valores de gordura corporal utilizados no presente trabalho são oriundos desta última análise, pois, além de ser utilizado equipamento com maior acurácia, as

adolescentes seguiram um protocolo específico para esta avaliação, o que não foi possível de ser realizado durante a triagem. Só então as adolescentes foram incluídas na pesquisa, de modo que cada grupo de estudo fosse composto por 24 adolescentes.

Após a aferição dos parâmetros bioquímicos, do grupo de adolescentes com sobrepeso foram selecionadas 10 adolescentes sem resistência insulínica, as quais constituíam o grupo controle, e 10 adolescentes com resistência insulínica:

- Grupo controle (Si): adolescentes que apresentavam IMC acima dos valores de percentil 85 segundo idade e gênero, de acordo com as curvas do CDC/NHS de 2000 (Kuczmarski et al., 2000), e índice HOMA-IR < 3,16;
- Grupo resistência insulínica (Ri): adolescentes que apresentavam IMC acima dos valores de percentil 85 segundo idade e gênero, de acordo com as curvas do CDC/NHS de 2000 (Kuczmarski et al., 2000), e índice HOMA-IR  $\geq$  3,16.

#### *4.3.2 Coleta de dados*

A coleta de dados ocorreu no período de março a agosto de 2007. O estudo foi desenvolvido após aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Federal de Viçosa (UFV) (**Anexo I**).

O convite para participação no estudo foi realizado dentro da escola em que a adolescente estudava, após autorização da direção da instituição em questão. Nesta oportunidade, foram explicados os objetivos da pesquisa e os procedimentos necessários para participação no estudo. Todas as adolescentes que atenderam aos critérios de inclusão foram convidadas a participar do estudo. A inclusão das adolescentes ocorreu após consentimento por escrito dos pais ou responsáveis, mediante assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (**Anexo II**).

Aquelas que quiseram participar e foram autorizadas pelos pais ou responsáveis tiveram agendadas as datas e os horários, para que fosse possível a aplicação dos questionários e realização das avaliações. As adolescentes foram atendidas individualmente na Divisão de Saúde da UFV, em sala própria, evitando assim qualquer tipo de constrangimento.

Foram aplicados questionários compostos por questões referentes a dados sócio-econômicos, realizada a avaliação do estado nutricional e dos parâmetros bioquímicos (**Anexo III**). A coleta de sangue para avaliação bioquímica foi realizada no Laboratório de Análises Clínicas da Divisão de Saúde da UFV, no mesmo dia em que procedeu-se a avaliação nutricional.

Após avaliação dos dados, as adolescentes receberam o diagnóstico de sua situação nutricional e, quando necessário, receberam atendimento individual no Programa de Atenção à Saúde do Adolescente (PROASA) da UFV e material educativo com informações acerca de uma alimentação saudável (**Anexo IV**).

#### 4.3.3 Caracterização da população

Foram aplicados questionários contendo questões referentes à idade, escolaridade, dados sócio-econômicos, idade da menarca, hábito de fumar e consumo de bebidas alcoólicas.

#### 4.3.4 Antropometria

Para avaliação antropométrica foram utilizados os parâmetros peso, altura e circunferência da cintura, aferidos por único observador capacitado para tal. O peso e a altura foram utilizados para cálculo do IMC.

##### - *Peso*

O peso foi aferido em balança eletrônica com capacidade para 150Kg e subdivisão de 0,1kg. As adolescentes vestiam o mínimo de roupas possível, sem relógios, adornos, carteiras, chaves, celular e outros objetos que pudessem interferir no peso, conforme as técnicas preconizadas por Jelliffe (1968).

##### - *Altura*

A altura foi aferida por meio da utilização de estadiômetro vertical portátil milimetrado, com extensão de 2 metros e escala de 1mm. As adolescentes estavam descalças, o corpo firmemente encostado na superfície, de costas para o marcador, com os calcanhares unidos e os pés formando um ângulo de 45°, em posição ereta, olhando para o horizonte (Jelliffe, 1968). A leitura foi no centímetro mais próximo quando o esquadro encostou na cabeça da adolescente.

##### - *Índice de Massa Corporal*

O Índice de Massa Corporal (IMC) foi obtido a partir dos valores de peso e estatura da adolescente. O IMC é calculado pela relação entre peso corporal total, em quilogramas, e estatura, em metros ao quadrado (WHO, 1998). Os pontos de corte e a referência antropométrica utilizados foram os preconizados pelo *Center for Disease Control and Prevention – National Center for Health Statistics* em 2000 (CDC/NCHS) (Kuczmarski et al., 2000), segundo percentis para gênero e idade

(Quadro 1). Foram consideradas com sobrepeso aquelas adolescentes que possuíam valores de IMC superiores ao percentil 85 (P85) das curvas do CDC.

**Quadro 1:** Pontos de corte para avaliação do estado nutricional de adolescentes, preconizados pelo CDC/NCHS de 2000.

<b>Indicador</b>	<b>Índice</b>	<b>Ponto de Corte</b>
Baixo peso	IMC para idade	< P 5
Eutrofia	IMC para idade	$\geq$ P5 e < P85
Risco de sobrepeso	IMC para idade	$\geq$ P 85 e $\leq$ P95
Sobrepeso	IMC para idade	> P 95

Fonte: Kuczmarski et al. (2000)

- *Circunferência da cintura*

Utilizou-se fita métrica inelástica, flexível e milimetrada, com extensão de 2 metros, tomando-se cuidado para não comprimir as partes moles. Esta medida foi aferida em duplicata no ponto médio entre o último arco costal e a crista ilíaca, correspondendo à menor circunferência abaixo das costelas e acima do umbigo. A adolescente permaneceu parada, com o músculo abdominal relaxado e seu peso distribuído igualmente nos dois pés, os quais ficaram aproximadamente 25 a 30 cm separados. A leitura foi feita o mais próximo de 0,1 cm no final de uma expiração normal (Taylor et al., 2000).

4.3.5 *Composição corporal*

- *Bioimpedância elétrica*

A composição corporal foi estimada utilizando-se o aparelho de bioimpedância elétrica horizontal (Biodynamics©, modelo 310, versão 7.1). Esta avaliação foi realizada no mesmo dia em que ocorreu a coleta sanguínea para avaliação dos dados bioquímicos, sendo precedida de 12 horas de jejum.

As medidas foram feitas com o indivíduo deitado sobre uma superfície não condutora, na posição supina, com braços e pernas abduzidos a 45 graus, a partir do corpo. Imediatamente antes da colocação dos eletrodos foi passado algodão embebido em álcool nas áreas de contato, para posterior posicionamento dos adesivos. Um eletrodo emissor foi colocado próximo à articulação metacarpo-falangea da superfície dorsal da mão direita e o outro distal do arco transversal da superfície superior do pé direito. Um eletrodo detector foi colocado entre as

proeminências distais do rádio e da ulna do punho direito e o outro, entre os maléolos medial e lateral do tornozelo direito, de acordo com o manual do fabricante (Manual de Utilização, 2006).

As adolescentes submetidas a esta técnica, foram orientadas a obedecer a procedimentos prévios, sem os quais os resultados poderiam ser comprometidos:

- Estar a 7 dias da última menstruação ou a 7 dias da data da próxima menstruação;
- Jejum de 4 horas (em virtude da realização dos exames bioquímicos no mesmo dia, as adolescentes fizeram jejum de 12h);
- Não fazer uso de diuréticos pelo menos 7 dias antes do exame;
- Não realizar atividades físicas nas 12 horas que precede o exame;
- Não ingerir álcool nas 48 horas que antecedem o exame;
- Urinar 30 minutos antes da realização do exame;
- Retirar objetos metálicos durante o exame, como brinco, anéis, relógios, e outros;
- Não portar nenhum objeto metálico durante a aferição.

As recomendações para realização dos exames e bioimpedância foi entregue às adolescentes.

Os valores de gordura corporal foram utilizados na composição dos grupos de estudo, bem como na avaliação de sua relação com a inflamação crônica subclínica.

#### *4.3.6 Pressão arterial*

Para avaliação da pressão arterial, foi utilizado o monitor de pressão sanguínea de inflação automática. A técnica para aferição da pressão arterial estava de acordo com as normas da Sociedade Brasileira de Cardiologia (2006) e do manual do aparelho de pressão arterial automático.

Foram realizadas pelo menos três medidas, com intervalo de um minuto entre elas, sendo a média das duas últimas considerada a pressão arterial do indivíduo. Caso as pressões diastólicas obtidas apresentassem diferenças superiores a 4mmHg, novas verificações foram realizadas, até que se obtivessem medidas com diferença inferior a esse valor. As medições foram obtidas no membro superior esquerdo.

➤ Preparo da adolescente:

- O procedimento foi explicado às adolescentes, as quais mantiveram-se em repouso de pelo menos cinco minutos, em ambiente calmo, antes das aferições;

- Foi certificado que as adolescentes não estavam com a bexiga cheia, não praticaram exercícios físicos há 60-90 minutos, não ingeriram café, bebidas alcoólicas, alimentos ou fumaram até 30 minutos antes da aferição;
- As pernas foram mantidas descruzadas, pés apoiados no chão, dorso recostado na cadeira e relaxado;
- Foram removidas roupas do braço no qual o manguito foi colocado. O manguito utilizado era de tamanho adequado à circunferência do braço da adolescente.
- O braço foi posicionado na altura do coração (nível do ponto médio do esterno ou 4º espaço intercostal), apoiado, com a palma da mão voltada para cima e o cotovelo ligeiramente fletido;
- Foi solicitado às adolescentes que não falassem durante as aferições das medidas.

➤ Procedimento de medida de pressão arterial:

- Localizou-se a artéria braquial pressionando dois dedos (não utilizar o dedo polegar) a aproximadamente dois centímetros acima da dobra do cotovelo, pelo lado de dentro do braço esquerdo. Determinou-se onde a pulsação era mais forte;
- O manguito foi colocado sem deixar folgas acima da fossa antecubital, cerca de 2 a 3 cm, certificando-se que o marcador verde do manguito estivesse acima da artéria braquial;
- O manguito foi puxado de modo que as partes de cima e de baixo ficassem firmemente presas ao redor do braço;
- Quando o manguito estava posicionado corretamente, pressionou-se o velcro com firmeza e certificou-se de que ele estivesse firme ao redor do braço;
- Pressionou-se o botão ON/OFF;
- Após aparecer o símbolo do coração no painel digital, o botão Start foi pressionado e a adolescente permaneceu imóvel até que se completasse a medição;
- Quando a medida foi concluída, o monitor exibiu a pressão arterial e a taxa de batimentos cardíacos e o manguito é desinflado automaticamente;
- Os valores das pressões sistólica e diastólica foram registrados.
- Esperou-se 1 a 2 minutos antes de realizar novas medidas. Pode ser necessário mais tempo de descanso entre as leituras, dependendo das características fisiológicas de cada indivíduo;

#### 4.3.7 Avaliação bioquímica

Os parâmetros bioquímicos analisados foram: glicemia de jejum, insulinemia de jejum, HDL e triglicérides. As amostras foram colhidas por punção venosa, após 12 horas de jejum, com material descartável, sendo utilizado o analisador automático de parâmetros bioquímicos COBAS®. As análises foram realizadas no Laboratório de Análises Clínicas da Divisão de Saúde da UFV, no município de Viçosa-MG. Os níveis de insulina foram dosados em um laboratório de referência da cidade do Rio de Janeiro, RJ.

A resistência insulínica foi avaliada por meio do modelo matemático HOMA-IR (*Homeostasis Model Assessment - Insulin Resistance*), baseado na medida da glicemia e insulina de jejum (Geloneze & Tambascia, 2006):

$$\text{HOMA-IR} = \text{glicemia (mMol)} \times \text{insulina (uUmL)} \div 22,5$$

Valores de HOMA  $\geq 3,16$  caracterizavam adolescentes com resistência insulínica, enquanto que valores inferiores caracterizavam adolescentes sensíveis à insulina (I Diretriz de Prevenção da Aterosclerose na Infância e na Adolescência, 2005).

#### 4.3.8 Marcadores de risco para a síndrome metabólica

Em virtude da ausência de consenso acerca dos parâmetros e pontos de corte a serem utilizados no diagnóstico da síndrome metabólica em adolescentes, foram utilizados os parâmetros recomendados pelo National Cholesterol Education Program/Adult Treatment Panel III (NCEP/ATPIII) em 2001 para adultos (NCEP, 2001). Tal escolha baseou-se na maior utilização desta referência na população adulta, bem como na relativa facilidade de obtenção dos parâmetros preconizados (**Tabela 1**).

**Tabela 1** - Parâmetros propostos para diagnóstico clínico da Síndrome Metabólica pelo National Cholesterol Education Program/Adult Treatment Panel III\* .

Parâmetros
<ul style="list-style-type: none"><li>• Glicemia de jejum</li><li>• Circunferência da cintura</li><li>• Triglicérides</li><li>• HDL (<i>high density lipoprotein</i>)</li><li>• Pressão Arterial (sistólica e diastólica)</li></ul>

\*I Diretriz Brasileira de Diagnóstico e Tratamento da Síndrome Metabólica, 2005

Apesar de não incluídas no critério proposto pelo NCEP/ATPIII, a insulinemia de jejum e a resistência insulínica também foram consideradas fatores de risco para síndrome metabólica, tendo em vista que a resistência insulínica/hiperinsulinemia é considerada o principal fator fisiopatológico da síndrome metabólica (I Diretriz Brasileira de Diagnóstico e Tratamento da Síndrome Metabólica, 2005).

#### 4.3.9 *Quantificação do mRNA dos marcadores inflamatórios*

A quantificação dos marcadores inflamatórios foi feita por meio da técnica quantitativa “Real-Time Polymerase Chain Reaction” (RT-PCR). Para tal, foi coletado o “buffy coat” (concentrado de leucócitos) do sangue das adolescentes, após centrifugação do sangue venoso a 2.260g por 10 minutos em tubo contendo anticoagulante (tubo vacutainer® com EDTA). Após coleta, o buffy coat foi congelado imediatamente em nitrogênio líquido, e conservado a -80°C até o momento das análises.

A utilização de células sanguíneas parece conveniente no estudo da expressão gênica, uma vez que tal amostra pode ser facilmente coletada em suficientes quantidades e utilizando-se de métodos menos invasivos, em contraste a coleta de outros tecidos, como o adiposo, muscular e hepático. Além disso, seus resultados são mais reprodutíveis e são sensíveis em relação à presença de inflamação subclínica na população estudada (Mello et al., 2008). A escolha da amostra (“buffy coat”) para análise baseou-se no fato de que as citocinas expressas pelo tecido adiposo seriam responsáveis pela ampliação periférica do sinal inflamatório, por meio do estímulo das células mononucleares do sistema imune.

##### ✓ *Extração do RNA*

O RNA total da amostra de “Buffy Coat” foi extraído utilizando o reagente Trizol (Invitrogen®). Em um “eppendorf” de 2mL, foram adicionados 1mL de Trizol, incubando por 5 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, foram adicionados 150µL de clorofórmio, agitando manualmente por 15 segundos e incubando à temperatura ambiente por 2 minutos. Após centrifugação (12.000g por 15 minutos à 4°C), a fase aquosa foi transferida para um novo “eppendorf” de 2mL, no qual foram adicionados 380µL de isopropanol. A amostra foi incubada por 10 minutos à temperatura ambiente, e então centrifugada a 12.000g por 10 minutos a 4°C. Após este processo, o sobrenadante foi cuidadosamente desprezado, e o precipitado foi lavado com 750µL de etanol gelado (75%), mantendo esta solução

estocada a  $-70^{\circ}\text{C}$  “overnight”. Após este período, a amostra foi centrifugada (7500g por 10 minutos à  $20^{\circ}\text{C}$ ), desprezando-se cuidadosamente o sobrenadante e secando o precipitado a  $37^{\circ}\text{C}$ . Na última fase, a amostra foi suspendida em  $40\mu\text{L}$  de água deionizada, autoclavada, e incubada por 10 minutos a  $35^{\circ}\text{C}$ , a fim de facilitar a solubilização do RNA extraído.

✓ *Reações de real time RT-PCR*

O DNA complementar foi confeccionado utilizando  $11\mu\text{L}$  de mRNA extraído, por meio de reação utilizando a enzima transcriptase reversa (Fermentas). A análise quantitativa do mRNA foi realizada pela técnica de PCR em tempo real no equipamento 7300 Real-Time PCR System - Applied Biosystems, utilizando o sistema de quantificação por fluorescência SYBR-Green (Platinum® SYBR® Green qPCR SuperMix with ROX - Invitrogen). O ciclo da PCR envolveu uma desnaturação inicial de  $95^{\circ}\text{C}$  (10 minutos) e então 40 ciclos, com 1 minuto de desnaturação ( $94^{\circ}\text{C}$ ), 1 minuto de anelamento ( $56^{\circ}\text{C}$ ) e 2 minutos de alongamento ( $72^{\circ}\text{C}$ ), seguidos da curva padrão de dissociação.

As seqüências dos “primers” utilizados (“sense” e “antisense”) e suas propriedades de reação estão descritas no **Quadro 2**. As condições de PCR foram otimizadas considerando a concentração do “primer”, ausência de formação de dímeros, eficiência na amplificação dos genes alvo e controle dos genes constituintes.

Para cada reação foram utilizados  $20\mu\text{L}$  de *primers* (400nM),  $5\mu\text{L}$  de cDNA e  $25\mu\text{L}$  de SBYR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems). Os limites de detecção para o resultado positivo da RT-PCR foram baseados nas concentrações ao início do estudo. Cálculos para determinação do nível relativo de expressão do gene foram feitos de acordo com instruções do fabricante – “User’s Bulletin from Applied Biosystems” - tendo como referência a  $\beta$ -actina da amostra, usando o método *cycle threshold* (Ct). O Ct é ponto onde um aumento exponencial significativo na quantidade de amplificado (fluorescência) é primeiramente detectado (geralmente 10 vezes o valor inicial). As médias dos valores das duplicatas do Ct dos indivíduos do estudo foram utilizadas para calcular a expressão do gene de interesse de cada indivíduo do grupo, com a normalização de um controle interno ( $\beta$  - actina). Esse valor foi então comparado com a expressão do gene de indivíduos controle para cálculo do aumento da expressão do gene, utilizando a fórmula  $2^{-\Delta\text{Ct}}$ , de acordo com as orientações do fabricante.

**Quadro 2:** Seqüência dos *primers* e propriedades de reação.

Gene	Seqüências Sense e Anti-sense	tA (°C) <sup>1</sup>	tM (°C) <sup>2</sup>	pb <sup>3</sup>
<b>B-actina</b>	ATGTTTGAGACCTTCAACA CACGTCAGACTTCATGATGG	56	75	495
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	AAGCCTGTAGCCCATGTTGT CAGATAGATGGGCTCATACC	56	79	330
<b>IL-6</b>	AAGCCAGAGCTGTGCAGATGA ATTTGCCGAAGAGCCCTCA	59	80	220
<b>IL-10</b>	AGATC TCCGAGATGC CTTCA CCGTGGAGCAGGTGAAGAAT	58	85	307

<sup>1</sup> Temperatura de anelamento

<sup>2</sup> Temperatura de *melting*

<sup>3</sup> Pares de base

#### 4.4 Processamento de dados e análise estatística

O banco de dados foi elaborado no software *Microsoft® Office Excel 2003*.

A análise dos dados foi realizada utilizando o software *Sigma Statistic® for Windows*, versão 2.0, sendo utilizado o teste não paramétrico Mann-Whitney para grupos independentes, e o coeficiente de correlação de Pearson para avaliação da correlação entre variáveis não paramétricas. O nível de rejeição da hipótese de nulidade foi  $< 0,05$  ou 5%.

Para confecção dos gráficos, foi utilizado o software *GraphPad Prism® 1999*, versão 3.0.

#### 4.5 Aspecto ético

O estudo foi desenvolvido após aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Federal de Viçosa (**Anexo I**).

## Referências Bibliográficas

I Diretriz Brasileira de Diagnóstico e Tratamento da Síndrome Metabólica. Arq Bras Cardiol 2005, 84 (supl. 1).

Jelliffe DB. Evaluacion del estado de nutrición de la comunidad. Ginebra, Organización Mundial de la Salud, 1968 (Serie de monografias, 53).

Kuczmarski RJ, Ogden CL, Grummer-Strawn LM, Flegal KM, Guo SS, Wei R. CDC growth charts: United States. Adv Data 2000, 8(314):1-27.

Lohman TG. Assessing fat distribution. In: Advances in body composition assessment: current issues in exercise science. Illinois, Human Kinetics. Champaign 1992, 57-63.

Manual de Utilização do BIODYNAMICS MODEL 310. 2001. Disponível em: <http://www.biodyncorp.com/product/310/310.html> [acessado em: 10/03/2006].

Mello VDF, Kolehmainen M, Schwab U, Mager U, Laaksonen DE, Pulkkinen L, Niskanen L, Gylling H, Atalay M, Rauramaa R, Uusitupa M. Effect of weight loss on cytokine messenger RNA expression in peripheral blood mononuclear cells of obese subjects with the metabolic syndrome. Metabolism 2008, 57(2):192-9.

NCEP. Executive summary of the third report of National Cholesterol Education Program (NCEP) expert panel on detection, evaluation, and treatment of high blood cholesterol in adults (Adult Treatment Panel III). JAMA 2001, 285(19):2486-97.

Pearson TA, Mensah GA, Alexander RW, Anderson JL, Cannon RO, Criqui M, Fadl YY, Fortmann SP, Hong Y, Myers GL, Rifai N, Smith SC, Taubert K, Tracy RP, Vinicor F. Markers of inflammation and cardiovascular disease: application to clinical and public health practice: a statement for Healthcare Professionals From the Centers for Disease Control and Prevention and the American Heart Association. Circulation 2003, 107(3):499-511.

Sociedade Brasileira de Cardiologia. V Diretrizes Brasileiras de Hipertensão Arterial, 2006. Disponível em: <http://publicacoes.cardiol.br/consenso/> [acesso em: 01/08/2007]

Taylor EW, Jones IE, Williams SM, Goulding A. Evaluation of waist circumference, waist-to-hip ratio, and the conicity index as screening tools for high trunk fat mass, as measured by dual-energy X-ray absorptiometry, in children aged 3-19y. Am J Clin Nutr 2000, 72(2):490-5.

Vitalle MSS, Tomioka CY, Juliano Y, Amancio OMS. Índice de massa corporal, desenvolvimento puberal e sua relação com a menarca. Rev Ass Bras Med 2003, 49(4):429-33.

WHO. World Health Organization. Obesity. Preventing and Managing the global epidemic. Report of a WHO consultation on obesity. Geneva: World Health Organization; 1998.

## 5.1 ARTIGO 1: Expressão periférica de marcadores inflamatórios em adolescentes do gênero feminino com sobrepeso e nas “metabolicamente obesas de peso normal”.

Carvalho, G.Q.; Pereira, P.F; Serrano, H.M.S; Franceschini, S.C.C.; De Paula, S.O.; Priore, S.E; Peluzio, M.C.G.

### RESUMO

**Objetivos:** Avaliar a expressão periférica de TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-10 em adolescentes do gênero feminino com sobrepeso e nas “metabolicamente obesas de peso normal”, e a relação entre a expressão dessas citocinas e os parâmetros da síndrome metabólica. **Metodologia:** Avaliou-se 72 adolescentes do gênero feminino pós-púberes, de 14 a 17 anos, divididas em 3 grupos: eutróficas (G1), “metabolicamente obesas de peso normal” (G2) e sobrepeso (G3). Coletaram-se dados relacionados aos parâmetros da síndrome metabólica: circunferência da cintura, glicemia de jejum, insulinemia de jejum, resistência insulínica, triglicerídeos, HDL, pressão arterial sistólica e diastólica. Avaliou-se a expressão periférica de TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-10, e a correlação entre a expressão periférica dessas citocinas e os parâmetros da síndrome metabólica. **Resultados:** G2 apresentou valores intermediários de peso, IMC e %GC em comparação com G1 e G3. Maiores valores de glicemia e de resistência insulínica foram verificados no G2 em relação ao G1, não diferindo do G3. G2 apresentou maiores valores de insulinemia e menores de HDL que G3. Avaliando-se a expressão periférica das citocinas do G2 e G3 em relação ao G1, G3 apresentou aumento na expressão de TNF- $\alpha$  e IL-10 de 6% e 31%, respectivamente, e o G2 apresentou aumento de 44% na expressão de IL-6, não havendo diferenças na expressão das citocinas entre G2 e G3. Verificou-se correlação positiva entre TNF- $\alpha$  e IL-6, e entre IL-10 e as citocinas pró-inflamatórias nas adolescentes do G2, e nas adolescentes com excesso de gordura corporal (G2 + G3), e correlação positiva entre a IL-6 e glicemia (grupo G2), e entre IL-6 e triglicerídeos (grupo G3). **Conclusão:** Adolescentes “metabolicamente obesas de peso normal” apresentaram perfil metabólico, inflamatório e de composição corporal semelhante à de adolescentes com sobrepeso. Demonstrou-se possível relação entre IL-6 e glicemia e triglicerídeos. A correlação positiva entre IL-10 e TNF- $\alpha$  e IL-6, bem como a maior expressão de IL-10 nas adolescentes com sobrepeso em relação às eutróficas, sugere tentativa de inibição da produção dessas citocinas pela IL-10.

**Palavras-chave:** Adolescentes, obesidade, síndrome metabólica, inflamação subclínica.

**ARTICLE 1: Peripheral expression of inflammation makers in female overweight adolescents and in those “metabolic obese normal weight”.**

Carvalho, G.Q.; Pereira, P.F; Serrano, H.M.S; Franceschini, S.C.C.; De Paula, S.O.; Priore, S.E; Peluzio, M.C.G.

**ABSTRACT**

**Objectives:** To evaluate the peripheral expression of TNF- $\alpha$ , IL-6 and IL-10 in overweight female adolescents and in those “metabolic obese normal weight”, and to verify the relationship between peripheral expression of those cytokines and the metabolic syndrome parameters. **Methodology:** 72 female adolescents in post-pubescent were evaluated, 14 to 17 years old. They were divided into 3 groups: eutrophic (G1), “metabolic obese normal weight” (G2) and overweight (G3). Data related to the parameters of the metabolic syndrome were collected: waist circumference, fasting plasma glucose, fasting insulin, insulin resistance, triglycerides, HDL, systolic and diastolic blood pressure. It was evaluated the expression of those cytokines, and the correlation of those cytokines with the parameters of the metabolic syndrome. **Results:** G2 had intermediary values of weight, IMC and %GC in comparison to G1 and G3. Glicemia and insulin resistance were increased in G2 in comparison to G1, not differing of the G3. Insulinemia was increased and HDL was decreased in G2 in comparison to G3. Evaluating the peripheral expression of cytokines of G2 and G3 in comparison to G1, G3 had increase of 6% and 31% in expression of TNF- $\alpha$  and IL-10, respectively, and G2 had increase of 44% in expression of IL-6, without differences in the expression of cytokines between G2 and G3. There was positive correlation between TNF- $\alpha$  and IL-6, and between IL-10 and pro-inflammatory cytokines in the adolescents of G2, and in the adolescents with excess of body fat (G2 + G3), and positive correlation between IL-6 and glicemia (G2 group), and between IL-6 and triglycerides (G3 group). **Conclusion:** “Metabolic obese normal weight” adolescents had metabolic profile, inflammatory profile and body composition similar to adolescents with overweight. It demonstrated the possible relation between IL-6 and glicemia and triglycerides. The positive correlations between IL-10 and TNF- $\alpha$ , IL-10 and IL-6, as well as the increased expression of IL-10 in overweight adolescents regarding the eutrophic, suggests an attempt to inhibition the production of these cytokines by IL-10.

**Key-words:** Adolescents, obesity, metabolic syndrome, subclinical inflammation.

### 5.1.1 Introdução

O aumento dos casos de obesidade em crianças e adolescentes é evidente tanto nos países desenvolvidos quanto naqueles em desenvolvimento. Adolescentes obesos apresentam maior risco de permanecerem obesos na vida adulta, e/ou apresentarem doenças crônicas relacionadas à obesidade. Evidências sugerem que as co-morbidades estão presentes cada vez mais cedo, acometendo já crianças e adolescentes. Apesar de pouca informação acerca das conseqüências da obesidade na infância, é consenso que os efeitos desta doença são similares em crianças e adultos, sendo de curto e médio prazo na infância, podendo se estender em longo prazo, na vida adulta (Daniels et al., 2005).

O tecido adiposo é considerado o “link” entre a obesidade e o desenvolvimento de doenças cardiovasculares. Além de estocar calorias na forma de triglicerídeos, este tecido secreta uma enorme variedade de proteínas conhecidas como adipocinas, as quais atuam nas mais diversas funções, regulando o apetite e o balanço energético, a imunidade, a sensibilidade à insulina, a angiogênese, a pressão arterial, o metabolismo lipídico e a homeostasia. Todas essas funções estão direta ou indiretamente ligadas ao desenvolvimento de doenças cardiovasculares. Quando ocorre desequilíbrio na produção e/ou atuação das adipocinas, pode haver o aparecimento de doenças cardiovasculares (Ronti et al. 2006)

Várias adipocinas modulam o processo inflamatório do organismo, como a leptina, adiponectina, as interleucinas (IL) e o Fator de Necrose Tumoral – alfa (TNF- $\alpha$ ). A obesidade caracteriza-se pelo estado de inflamação crônica subclínica, com aumento da expressão de substâncias pró - inflamatórias e inibição daquelas antiinflamatórias. Algumas citocinas pró - inflamatórias favorecem o estado de hiperinsulinemia, agindo diretamente nos receptores de insulina, e propiciando o desenvolvimento de resistência insulínica, e, conseqüentemente, da síndrome metabólica nestes indivíduos (Juge-Aubry et al., 2005).

As citocinas secretadas pelo tecido adiposo, principalmente IL-1 $\beta$ , IL-6 e TNF- $\alpha$ , são capazes de estimular a síntese hepática de proteínas de fase aguda *in vivo* e *in vitro* (Richards et al. 1991) além de estimular a ativação e aumento numérico das células inflamatórias nos linfonodos e na corrente sanguínea (Fantuzzi, 2005). Sugere-se que a obesidade e a resistência insulínica em humanos sejam associadas à ativação de células inflamatórias mononucleares e ao aumento da expressão de citocinas, embora tais células não sejam a fonte primária para elevação das citocinas

inflamatórias em indivíduos obesos (Mello et al., 2008). As células mononucleares periféricas se encontram ativadas e em maior número em indivíduos obesos (Ghanim et al., 2004).

Uma condição que tem chamado a atenção de especialistas são os indivíduos que possuem peso normal, mas que apresentam excesso de gordura corporal (De Lorenzo et al., 2006). Segundo alguns autores, estes indivíduos podem apresentar risco de desenvolvimento de distúrbios metabólicos semelhante ao de indivíduos obesos, sendo conhecidos como “metabolicamente obesos de peso normal” (Ruderman et al., 1981; De Lorenzo et al., 2006). Assim, o excesso de gordura corporal é considerado fator de risco para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares, independente do excesso de peso corporal (Taylor et al., 2002). Essa é uma população pouco estudada, principalmente adolescentes, e pouco se sabe sobre a expressão de marcadores inflamatórios nestes indivíduos.

Devido à existência de poucos estudos que avaliassem o processo de inflamação subclínica em indivíduos metabolicamente obesos de peso normal, torna-se importante a realização de estudos que avaliem as alterações metabólicas em crianças e adolescentes. A tendência de aumento nos casos de obesidade na população jovem e a baixa sensibilidade do IMC no diagnóstico de obesidade em adolescentes aumentam a relevância e o impacto desses estudos (Taylor et al., 2002).

Neste estudo, avaliou-se a expressão periférica de TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-10 em adolescentes do gênero feminino com sobrepeso e nas “metabolicamente obesas de peso normal”, e a relação entre a expressão dessas citocinas e os parâmetros da síndrome metabólica.

## **5.1.2 Metodologia**

### ***5.1.2.1 Casuística***

Trata-se de estudo epidemiológico, transversal, controlado. A população avaliada constituiu 72 adolescentes do gênero feminino, com idade entre 14 e 17 anos, estudantes de escolas públicas de Viçosa – MG. Utilizou-se como critério de exclusão a utilização de medicamentos ou a presença de doenças que interferiam na expressão de marcadores inflamatórios, na pressão arterial, no perfil lipídico e/ou metabolismo glicídico, e aquelas em período gestacional. Também foram excluídas adolescentes com valores de Proteína C Reativa >10 mg/L, sendo este valor caracterizado como presença de possível processo inflamatório ou infecção, o que

poderia afetar os resultados referentes à expressão de marcadores inflamatórios (Pearson et al., 2003). Assim, procurou-se garantir a homogeneidade da amostra, bem como diminuir as interferências na avaliação bioquímica, clínica e de composição corporal.

As adolescentes selecionadas apresentaram menarca há pelo menos 1 ano. A escolha de meninas que já tenham apresentado a menarca é devido ao fato do estágio de maturação sexual estar relacionado com a composição corporal, e que a presença da menarca caracteriza o estágio maturacional próximo do final (Vitalle et al., 2003).

A inclusão das adolescentes ocorreu após consentimento por escrito dos pais ou responsáveis, mediante assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido. O estudo foi desenvolvido após aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Federal de Viçosa (UFV).

#### **5.1.2.2 Métodos**

As avaliações antropométrica, de composição corporal e pressão arterial foram realizadas por único observador capacitado, no Ambulatório do Programa de Atenção à Saúde do Adolescente (PROASA) da UFV. As coletas sanguíneas foram realizadas por profissional capacitado no Laboratório de Análises Clínicas da Divisão de Saúde da UFV.

#### ***Medidas Antropométricas e Composição Corporal***

O peso e a estatura foram aferidos segundo recomendações de Jelliffe (1968), e utilizados para obtenção do Índice de Massa Corporal (IMC). O IMC é calculado pela relação entre peso corporal total, em quilogramas, e estatura, em metros ao quadrado. Utilizou-se os pontos de corte e a referência antropométrica preconizados pelo *Center for Disease Control and Prevention – National Center for Health Statistics – CDC/NCHS* de 2000, segundo percentis para gênero e idade, considerando-se com sobrepeso aquelas que possuíam valores de IMC superiores ao percentil 85 (P85) das curvas do CDC de 2000 (Kuczmarski et al., 2000).

A circunferência da cintura (CC) foi aferida durante expiração normal, em duplicata, no ponto médio entre o último arco costal e a crista ilíaca, correspondendo à menor circunferência abaixo das costelas e acima do umbigo (Taylor et al., 2000).

A composição corporal foi estimada utilizando-se o aparelho de bioimpedância elétrica horizontal (Biodynamics®, modelo 310, versão 7.1). Esta avaliação foi realizada no mesmo dia em que ocorreu a coleta sanguínea para

avaliação dos dados bioquímicos, sendo precedida de 12 horas de jejum. As adolescentes foram orientadas a seguir procedimentos prévios, a fim de não comprometer os resultados: estar há pelo menos 7 dias da data da última menstruação e 7 antes da próxima; não fazer uso de diuréticos pelo menos nos 7 dias anteriores à realização do exame; não realizar exercício físico nas 12 horas anteriores à realização do exame e urinar 30 minutos antes da realização do exame, apresentando-se com a bexiga vazia.

Utilizando-se dos valores de IMC e da composição corporal, a amostra foi dividida em 3 grupos:

- Controle (G1): adolescentes que apresentavam IMC entre os percentis 25 e 85, segundo idade e gênero, de acordo com as curvas do CDC 2000 (Kuczmarski et al., 2000) e percentual de gordura corporal total entre 20% e 25%, de acordo com Lohman (1992). Tratava-se de um grupo composto por apenas adolescentes eutróficas.
- “Metabolicamente obesas de peso normal” (G2): adolescentes que apresentavam IMC entre os percentis 25 e 85, segundo idade e gênero, de acordo com as curvas do CDC 2000 (Kuczmarski et al., 2000) e percentual de gordura corporal total  $\geq 28\%$ . Dessa forma, as adolescentes eram eutróficas segundo o IMC, porém apresentavam gordura corporal elevada.
- Sobrepeso (G3): adolescentes que apresentavam IMC acima do percentil 85 segundo idade e gênero, de acordo com CDC 2000 (Kuczmarski et al., 2000), e percentual de gordura corporal total  $\geq 28\%$ . Neste grupo, as adolescentes apresentavam tanto peso e quanto gordura corporal elevados.

#### Pressão Arterial Sistêmica

Para avaliação da pressão arterial, foi utilizado o monitor de pressão sanguínea de inflação automática. A técnica para aferição da pressão arterial estava de acordo com as normas da Sociedade Brasileira de Cardiologia (2006) e do manual do aparelho de pressão arterial automático.

Foram realizadas pelo menos três medidas, com intervalo de um minuto entre elas, sendo a média das duas últimas considerada a pressão arterial do indivíduo. Caso as pressões diastólicas obtidas apresentassem diferenças superiores a 4mmHg, novas verificações foram realizadas, até que se obtivessem medidas com diferença inferior a esse valor. As medições foram obtidas no membro superior esquerdo.

### Avaliação bioquímica

Os parâmetros bioquímicos analisados foram: glicemia de jejum, insulinemia de jejum, HDL e triglicerídeos. As amostras foram colhidas por punção venosa, após 12 horas de jejum, com material descartável, sendo utilizado o analisador automático de parâmetros bioquímicos COBAS<sup>®</sup>. As análises foram realizadas no Laboratório de Análises Clínicas da Divisão de Saúde da UFV, no município de Viçosa-MG. Os níveis de insulina foram dosados em um laboratório de referência da cidade do Rio de Janeiro, RJ.

A resistência insulínica foi avaliada por meio do modelo matemático HOMA-IR (*Homeostasis Model Assessment - Insulin Resistance*), baseado na medida da glicemia e insulina de jejum (Geloneze & Tambascia, 2006):

$$\text{HOMA-IR} = \text{glicemia (mMol)} \times \text{insulina (uUmL)} \div 22,5$$

### Marcadores de risco para a Síndrome Metabólica

Em virtude da ausência de consenso acerca dos parâmetros e pontos de corte a serem utilizados no diagnóstico da síndrome metabólica em adolescentes, foram utilizados os parâmetros recomendados pelo National Cholesterol Education Program/Adult Treatment Panel III (NCEP/ATPIII) em 2001 para adultos (NCEP, 2001). Tal escolha baseou-se na maior utilização desta referência na população adulta, bem como na relativa facilidade de obtenção dos parâmetros preconizados.

Segue os parâmetros propostos para diagnóstico clínico da Síndrome Metabólica pelo NCEP/ATP III (NCEP, 2001) para adultos:

- Glicemia de jejum
- Circunferência da cintura (CC)
- Triglicerídeos (TG)
- HDL (*high density lipoprotein*)
- Pressão Arterial (sistólica e diastólica – PAS e PAD)

Apesar de não incluídas no critério proposto pelo NCEP (2001), a insulinemia de jejum e a resistência insulínica também foram consideradas fatores de risco para síndrome metabólica, tendo em vista que a resistência insulínica/hiperinsulinemia é considerada o principal fator fisiopatológico da síndrome metabólica (I Diretriz Brasileira de Diagnóstico e Tratamento da Síndrome Metabólica, 2005).

### Quantificação do mRNA dos marcadores inflamatórios

A quantificação dos marcadores inflamatórios foi feita por meio da técnica quantitativa “Real-Time Polymerase Chain Reaction” (RT-PCR). Para tal, foi coletado o “buffy coat” (concentrado de leucócitos) do sangue das adolescentes, após centrifugação do sangue venoso a 2.260g por 10 minutos em tubo contendo anticoagulante (tubo vacutainer® com EDTA). Após coleta, o buffy coat foi congelado imediatamente em nitrogênio líquido, e conservado a -80°C até o momento das análises.

#### ✓ Extração do RNA

O RNA total da amostra de “Buffy Coat” foi extraído utilizando o reagente Trizol (Invitrogen®). Em um “ependorf” de 2mL, foram adicionados 1mL de Trizol, incubando por 5 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, foram adicionados 150µL de clorofórmio, agitando manualmente por 15 segundos e incubando à temperatura ambiente por 2 minutos. Após centrifugação (12.000g por 15 minutos à 4°C), a fase aquosa foi transferida para um novo “ependorf” de 2mL, no qual foram adicionados 380µL de isopropanol. A amostra foi incubada por 10 minutos à temperatura ambiente, e então centrifugada a 12.000g por 10 minutos a 4°C. Após este processo, o sobrenadante foi cuidadosamente desprezado, e o precipitado foi lavado com 750µL de etanol gelado (75%), mantendo esta solução estocada a -70°C “overnight”. Após este período, a amostra foi centrifugada (7500g por 10 minutos à 20°C), desprezando-se cuidadosamente o sobrenadante e secando o precipitado a 37°C. Na última fase, a amostra foi suspendida em 40µL de água deionizada, autoclavada, e incubada por 10 minutos a 35°C, a fim de facilitar a solubilização do RNA extraído.

#### ✓ Reações de real time RT-PCR

O DNA complementar foi confeccionado utilizando 11µL de mRNA extraído, por meio de reação utilizando a enzima transcriptase reversa (Fermentas®). A análise quantitativa do mRNA foi realizada pela técnica de PCR em tempo real no equipamento 7300 Real-Time PCR System - Applied Biosystems, utilizando o sistema de quantificação por fluorescência SYBR-Green (Platinum® SYBR® Green qPCR SuperMix with ROX - Invitrogen). O ciclo da PCR envolveu uma desnaturação inicial de 95°C (10 minutos) e então 40 ciclos, com 1 minuto de denaturação (94°C), 1 minuto de anelamento (56°C) e 2 minutos de alongamento (72°C), seguidos da curva padrão de dissociação.

Utilizou-se os “primers” (“sense” e “antisense”) dos mediadores: TNF- $\alpha$ s 5' AAGCCTGTAGCCCATGTTGT 3' e TNF- $\alpha$ as 5' CAGATAGATGGGCTCAT-ACC 3', IL-6s 5' AAGCCAGAGCTGTGCAGATGA 3' e IL-6as 5' TTTGCCGAA -GAGCCCTCA 3', IL-10s 5' AGATCTCCGAGATGCCTTCA 3'e IL-10as 5' CCG-TGGAGCAGGTGAAGAAT 3', e B-actins 5' ATGTTTGAGACCTTCAACA 3' e B-actinas 5' CACGTCAGACTTCATGATGG 3'. As condições de PCR foram otimizadas considerando a concentração do primer, ausência de formação de dímeros, eficiência na amplificação dos genes alvo e controle dos genes constituintes.

Para cada reação foram utilizados 20 $\mu$ L de *primers* (400nM), 5 $\mu$ L de cDNA e 25 $\mu$ L de SBYR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems). Os limites de detecção para o resultado positivo da RT-PCR foram baseados nas concentrações ao início do estudo. Cálculos para determinação do nível relativo de expressão do gene foram feitos de acordo com instruções do fabricante - User's Bulletin from Applied Biosystems - tendo como referência a  $\beta$ -actina da amostra, usando o método *cycle threshold* (Ct). O Ct é ponto onde um aumento exponencial significativo na quantidade de amplificado (fluorescência) é primeiramente detectado (geralmente 10 vezes o valor inicial). As médias dos valores das duplicatas do Ct dos adolescentes de estudo (as com sobrepeso e as “eutróficas com elevado percentual de gordura corporal”) foram utilizadas para calcular a expressão do gene de interesse de cada indivíduo do grupo, com a normalização de um controle interno ( $\beta$  - actina). Esse valor foi então comparado com a expressão do gene de indivíduos controle para cálculo do aumento da expressão do gene, utilizando a fórmula  $2^{-\Delta Ct}$ , de acordo com as orientações do fabricante.

### **5.1.2.3 Análise estatística**

A análise dos dados foi realizada utilizando o software *Sigma Statistic® for Windows*, versão 2.0, sendo utilizado o teste não paramétrico Mann-Whitney para grupos independentes, e o coeficiente de correlação de Spearman para avaliação da correlação entre variáveis não paramétricas. O nível de rejeição da hipótese de nulidade foi  $< 0,05$  ou 5%.

Para confecção dos gráficos, foi utilizado o software *GraphPad Prism® 1999*, versão 3.0.

### 5.1.3 Resultados

A mediana (mínimo – máximo) de idade das adolescentes dos três grupos estudados foi de 15 anos (14 – 17). Foi possível verificar que o grupo G2 apresentava valores intermediários de peso, IMC e %GC em comparação com os grupos controle (G1) e sobrepeso (G3) (**Tabela 1**).

Quanto aos fatores relacionados com a síndrome metabólica (**Tabela 2**), pôde-se verificar que indivíduos do grupo G2 apresentavam maiores valores de glicemia e do índice HOMA, quando comparado com indivíduos eutróficos (G1). No entanto, os valores desses parâmetros não diferiram do grupo G3. O grupo G2 apresentou, ainda, maiores valores de insulinemia e menores de HDL que o grupo G3.

Neste estudo, foi avaliada a possível relação entre a presença de adiposidade elevada, dependente ou não do peso corporal elevado avaliado pelo IMC, e a expressão dos mediadores TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-10.

Avaliando-se a expressão das citocinas em relação ao grupo eutrófico, observou-se que o grupo G3 apresentou aumento na expressão de TNF- $\alpha$  e IL-10 de 6% e 31%, respectivamente (**Tabela 3**). O grupo G2 apresentou aumento de 44% na expressão de IL-6 em relação ao grupo eutrófico. No entanto, não houve diferença na expressão das citocinas entre os grupos G2 e G3 (**gráfico 1**).

Pode-se verificar correlação positiva entre TNF- $\alpha$  e IL-6, e entre IL-10 e as citocinas pró-inflamatórias nas adolescentes do grupo G2, e nas adolescentes com excesso de gordura corporal (G2 + G3) (**Tabelas 4 e 5**). Também foi encontrada associação entre a IL-6 e glicemia (grupo G2), e entre IL-6 e triglicérides (grupo G3) (**Tabelas 5 e 6**).

### 5.1.4 Discussão

As adolescentes com peso normal, mas com elevada porcentagem de gordura corporal (G2), possuíam valores intermediários de peso, IMC, gordura corporal e circunferência da cintura em relação às adolescentes eutróficas e àquelas com sobrepeso. No entanto, estas adolescentes (G2) apresentaram glicemia de jejum e o índice HOMA com valores superiores aos das adolescentes eutróficas, mas valores semelhantes aos das adolescentes obesas. Considerando que a resistência insulínica é uma das primeiras alterações observadas em indivíduos com síndrome metabólica, e

que a resistência insulínica é um fator comum das alterações desta síndrome, os resultados deste estudo são considerados relevantes (Sookoian et al., 2005). Adolescentes “metabolicamente obesas de peso normal” podem apresentar risco de desenvolvimento de doenças cardiovasculares semelhante ao de adolescentes com sobrepeso, provavelmente em decorrência do excesso de gordura corporal (De Lorenzo et al., 2006).

Ruderman et al. (1981) foram os primeiros autores a estudarem indivíduos com peso normal mas com quantidade elevada de gordura corporal, e que possuíam distúrbios metabólicos semelhantes a de indivíduos obesos, como redução na tolerância à glicose, resistência insulínica e maior prevalência de dislipidemias e hipertensão arterial, quando comparados com indivíduos eutróficos. Estes indivíduos denominados “metabolicamente obesos de peso normal” eram considerados obesos, mas sua obesidade não era revelada por parâmetros utilizados usualmente, os quais não distinguem a composição corporal, como o peso e a estatura. Estimava-se que essa condição estava presente apenas em indivíduos mais velhos, de meia-idade, no entanto, atualmente verifica-se indivíduos jovens que apresentam excesso de gordura corporal, embora permaneçam com peso adequado em relação à estatura (Taylor et al., 2002). Em 2006, De Lorenzo et al. (2006) propuseram a existência de uma nova síndrome: indivíduos com peso normal mas com quantidade elevada de gordura corporal, sem a obrigatoriedade de possuírem algum distúrbio metabólico, seriam os “obesos de peso normal”. Comparados com os eutróficos, estes indivíduos apresentavam maior risco de desenvolvimento de distúrbios metabólicos (De Lorenzo et al., 2006).

A utilização de células sanguíneas parece conveniente no estudo da expressão gênica, uma vez que tal amostra pode ser facilmente coletada em suficientes quantidades e utilizando-se de métodos menos invasivos, em contraste com outros tecidos, como o adiposo, muscular e hepático. Além disso, seus resultados são mais reprodutíveis e são sensíveis em relação à presença de inflamação subclínica na população estudada (Mello et al., 2008).

Comparando a expressão periférica de citocinas das adolescentes dos grupos G2 e G3 com aquelas do grupo G1, verificou-se que o grupo G2 apresentava aumento na expressão de IL-6, e o grupo G3 apresentou aumento na expressão periférica de TNF- $\alpha$  e IL-10, embora não tenha sido encontrada diferenças na expressão entre os grupos G2 e G3. Tais resultados sugerem que adiposidade pode determinar o perfil de inflamação subclínica de maneira mais sensível que outros

parâmetros relacionados à obesidade que não consideram a composição corporal, como o IMC, já que adolescentes com peso normal e elevado percentual de gordura corporal apresentavam aumento na expressão de IL-6. Apesar de o IMC ser fortemente correlacionado com a adiposidade, sua utilização pode ser limitada, já que este índice não distingue os compartimentos corporais (Kuczmarski et al., 2000).

Estudos realizados com adolescentes e crianças demonstraram a presença precoce de inflamação subclínica naqueles indivíduos com excesso de peso (Vikram et al., 2003; Ferranti et al., 2006; Kapiotis et al., 2006). A inflamação subclínica pode ser evidenciada também em adolescentes obesos pré-púberes. Em um estudo caso-controle, verificou-se que aqueles adolescentes com peso corporal acima de 120% em relação ao peso ideal também apresentavam maiores níveis das citocinas pró-inflamatórias IL-1 $\beta$ , IL-6 e TNF- $\alpha$  (Aygün et al., 2005). Entretanto, neste estudo, não foi avaliada a composição corporal das adolescentes, supondo que aquelas que apresentavam excesso de peso também possuíam excesso de gordura corporal, visto a alta correlação entre estes dois parâmetros. Esta condição pode ser vista na maioria dos trabalhos realizados, os quais utilizam o IMC como parâmetro para diagnóstico da obesidade.

Alguns autores consideram a inflamação subclínica como o elo entre a obesidade e os fatores de risco para desenvolvimento de doenças cardiovasculares (Berg et al., 2004). As citocinas inflamatórias estão associadas à diminuição do HDL-colesterol, aumento dos níveis de triglicérides e disfunção endotelial. Assim, as adipocinas representam fatores importantes na relação entre adiposidade, síndrome metabólica e doenças cardiovasculares (Hermsdorff e Monteiro, 2004). Segundo Gilardini et al. (2006), o aumento de mediadores pró-inflamatórios e a redução dos antiinflamatórios estão sendo recentemente adicionados aos componentes da síndrome metabólica, a qual é atualmente considerada um estado de inflamação crônica de baixa intensidade.

Ainda não existem valores de referência para a expressão de TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-10 que se relacionem ao desenvolvimento de doenças cardiovasculares. No entanto, sabe-se que a secreção de substâncias pró-inflamatórias pelos adipócitos, mesmo em pequenas quantidades, contribui para indução da inflamação e ativação da resposta imune inata. Isto porque as citocinas produzidas, na presença de algum estímulo, são bioativas em concentrações muito baixas, sendo que a ocupação de 10% de seu receptor é suficiente para desencadear uma resposta (Juge-Aubry et al., 2005).

A sugestão para a função do TNF- $\alpha$  secretado pelo adipócito se relaciona à sua ação como um adipostato, com efeito central na regulação do peso corporal. Os principais efeitos periféricos desta citocina correspondem à inibição da lipoproteína lipase (LPL), diminuição da expressão do transportador de glicose GLUT 4 e inibição da atividade do receptor de insulina (Bulló et al, 2002). Isto corresponde a uma tentativa do organismo em cessar o ganho de peso corporal por meio da inibição do acúmulo de gordura corporal no tecido adiposo. No entanto, como efeito adverso, tais alterações metabólicas induziriam ao desenvolvimento de dislipidemia, hiperglicemia e resistência insulínica, ao quais compõem os fatores de risco para síndrome metabólica. A IL-6, da mesma forma que o TNF- $\alpha$ , inibe a expressão da LPL, porém, diferente do TNF- $\alpha$ , não estimula a lipólise (Kern et al., 2001).

Quando avaliada a relação entre inflamação subclínica e componentes da síndrome metabólica nas adolescentes avaliadas no presente estudo, observou-se que a IL-6 correlacionou-se com a glicemia (grupo G2) e com os triglicerídeos (grupo G3). Isto sugere possível envolvimento da IL-6 no desenvolvimento de distúrbios metabólicos.

Pouco se sabe sobre as conseqüências da inflamação subclínica em longo prazo em crianças e adolescentes, entretanto sugere-se que ocorrência precoce deste distúrbio tenderia a agravar as morbidades relacionadas na idade adulta. No estudo de Paolisso et al. (1998), foi verificado que em uma amostra de 70 indivíduos com idade entre 21 e 94 anos, a correlação entre TNF- $\alpha$  plasmática e idade foi independente do gênero e da gordura corporal ( $r = 0,64$ ;  $P < 0,0001$ ). Faltam estudos acerca das conseqüências da inflamação subclínica em indivíduos jovens, principalmente dos efeitos futuros desta condição.

Em relação à IL-10, ao contrário do que tem sido descrito na literatura, houve ligeiro aumento de sua expressão nas adolescentes do grupo G3, e correlação positiva com a expressão das citocinas pró-inflamatórias (TNF- $\alpha$  e IL-6).

A IL-10 é uma citocina antiinflamatória produzida por células B, monócitos, macrófagos e células T helper, sendo sua produção estimulada pela presença de processos inflamatórios. Esta citocina age atenuando estes processos, a fim de proteger o organismo contra uma resposta inflamatória exacerbada e seus efeitos nocivos ao organismo. Assim, sugere-se que a alta expressão de IL-10 observada em adolescentes sobrepeso e a correlação positiva com IL-6 e TNF- $\alpha$ , encontrado no nosso estudo, pode representar uma tentativa de inibição da produção de citocinas pró-inflamatórias. Resultados semelhantes foram descritos por Esposito et al. (2003),

os quais ao encontrarem também valores aumentados para esta citocina em indivíduos obesos, afirmaram que, apesar de sua ação antiinflamatória, a produção de IL-10 não foi suficiente para sobrepor a ação dos marcadores pró-inflamatórios.

Geralmente, os estudos têm demonstrado que a IL-10 encontra-se reduzida em indivíduos obesos e em processos inflamatórios, suprimida pela presença das citocinas pró-inflamatórias. No estudo de Manigrasso et al. (2005), avaliando 104 mulheres obesas em idade reprodutiva e 20 mulheres saudáveis, a IL-10 apresentava-se reduzida nas obesas, principalmente naquelas com obesidade do tipo andróide. Já o estudo de Exel et al. (2002) demonstrou que a elevada expressão de IL-10 no sangue periférico poderia ser um fator protetor ao desenvolvimento de diabetes mellitus tipo 2.

No estudo de Singh et al. (2006), foi avaliado o efeito da proteína C reativa na expressão de IL-10 em monócitos humanos ativados pela presença de lipopolissacarídeos. Após incubação das células, foi verificado que a presença da proteína C reativa foi responsável pela redução da expressão de IL-10 em células mononucleares ativadas. Isto indica que as substâncias pró-inflamatórias ampliariam a inflamação subclínica em decorrência da inibição da via antiinflamatória, o que não foi encontrado em nosso estudo.

### **5.1.5 Conclusão**

Adolescentes com peso normal e excesso de gordura corporal apresentam perfil metabólico, inflamatório e de composição corporal semelhante à de adolescentes com sobrepeso.

O aumento da expressão das citocinas pró-inflamatórias foi verificado em nas adolescentes com excesso de gordura corporal, sendo maior a expressão de TNF- $\alpha$  nas adolescentes com sobrepeso, e de IL-6 nas “metabolicamente obesas de peso normal”.

Verificou-se resultado possível relação entre IL-6 e alguns parâmetros da síndrome metabólica. A correlação positiva entre IL-10 e TNF- $\alpha$  e IL-6 nos grupos avaliados, bem como a maior expressão de IL-10 nas adolescentes com sobrepeso, sugere tentativa de inibição da produção dessas citocinas pela IL-10. Infere-se que, apesar do aumento evidente da IL-10, a produção de citocinas pró-inflamatórias sobrepôs a ação desta citocina.

## 5.1.6 Tabelas e gráficos

**Tabela 1:** Características antropométricas de adolescentes do gênero feminino, estudantes de escolas públicas de Viçosa-MG.

	Eutrófico (G1)	“Metabolicamente obesas de peso normal” (G2)	Sobrepeso (G3)	Valor de p G2 vs. G1	Valor de p G2 vs. G3
<b>Idade (anos)</b>	15 (14 – 17)	15 (14 – 17)	15 (14 – 17)	<b>0,910</b>	<b>0,837</b>
<b>Peso (kg)</b>	49,850 (43,05 – 67,75)	56,70 (46,45 – 75,40)	67,05 (55,40 – 116,00)	<b>&lt;0,001</b>	<b>&lt;0,001</b>
<b>Estatura (cm)</b>	161,45 (148,00 – 174,50)	162,35 (150,50 – 178,90)	159,25 (148,60 – 169,20)	<b>0,959</b>	<b>0,120</b>
<b>IMC (kg/m<sup>2</sup>)</b>	19,17 (17,80 – 22,63)	22,06 (19,32 – 25,37)	26,10 (23,40 – 41,40)	<b>&lt;0,001</b>	<b>&lt;0,001</b>
<b>GC (%)</b>	23,00 (20,70 – 24,50)	30,50 (29,50 – 34,40)	32,25 (29,20 – 42,40)	<b>&lt;0,001</b>	<b>0,030</b>

Considerando  $p < 0,05$  (Mann-Whitney).

**Tabela 2:** Parâmetros relacionados à Síndrome Metabólica, em adolescentes do gênero feminino, estudantes de escolas públicas de Viçosa-MG.

	Eutrófico (G1)	“Metabolicamente obesas de peso normal” (G2)	Sobrepeso (G3)	Valor de p G2 vs. G1	Valor de p G2 vs. G3
<b>Glicemia (mg/dL)</b>	78,50 (70,00 – 93,00)	82,50 (69,00 – 104,00)	82,50 (65,00 – 92,00)	<b>0,016</b>	<b>0,695</b>
<b>Insulinemia (mg/dL)</b>	7,65 (2,50 – 16,30)	10,85 (5,50 – 47,80)	12,80 (6,30 – 39,80)	<b>0,053</b>	<b>0,044</b>
<b>HOMA-IR</b>	1,54 (0,51 – 3,74)	2,23 (1,10 – 12,26)	2,67 (1,21 – 8,55)	<b>0,020</b>	<b>0,099</b>
<b>Circunferência da cintura (cm)</b>	64,48 (60,50 – 70,35)	70,00 (61,15 – 81,75)	76,73 (67,60 – 105,20)	<b>&lt;0,001</b>	<b>&lt;0,001</b>
<b>Triglicerídeos (mg/dL)</b>	62,00 (24,00 – 125,00)	68,00 (41,00 – 219,00)	79,00 (39,00 – 114,00)	<b>0,252</b>	<b>0,599</b>
<b>HDL (mg/dL)</b>	51,00 (28,00 – 84,00)	49,50 (29,00 – 65,00)	44,00 (33,00 – 55,00)	<b>0,749</b>	<b>0,033</b>
<b>Pressão Sistólica (mmHg)</b>	99,50 (84,00 – 112,00)	107,00 (90,00 – 114,00)	106,00 (94,00 – 131,00)	<b>0,083</b>	<b>0,483</b>
<b>Pressão Diastólica (mmHg)</b>	67,00 (55,00 – 80,00)	73,00 (59,00 – 78,00)	71,50 (59,00 – 95,00)	<b>0,103</b>	<b>0,975</b>

Considerando  $p < 0,05$  (Mann-Whitney).

**Tabela 3:** Expressão das citocinas\* (número de vezes em relação ao grupo eutrófico) de adolescentes do gênero feminino, estudantes de escolas públicas de Viçosa-MG.

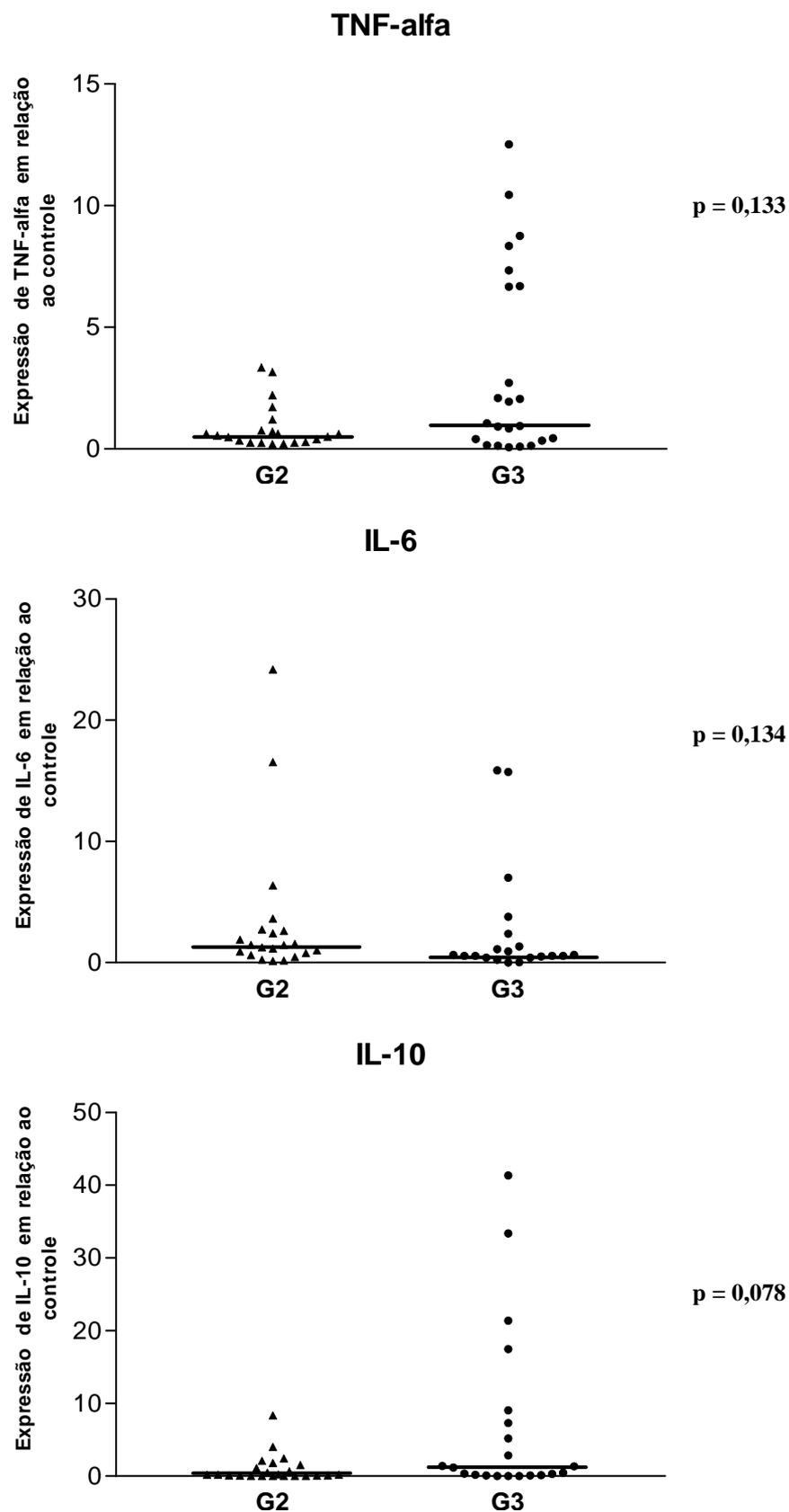
	<b>G2 (n=21)</b>	<b>G3 (n=23)</b>	<b>Valor de P</b>
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	0,54 (0,19 – 3,34)	1,06 (0,07 – 12,52)	0,133
<b>IL-6</b>	1,44 (0,130 - 24,180)	0,60 (0,0 - 15,860)	0,134
<b>IL-10</b>	0,19 (0,0 - 8,36)	1,2 (0,0 - 41,36)	0,078

\* Mediana (mínimo – máximo)

Considerando  $p < 0,05$  (Mann-Whitney).

Resultado de 1,8 significa um aumento na expressão de 80% em relação ao grupo eutrófico.

Resultado de 4,05 significa um aumento na expressão de 305% em relação ao grupo eutrófico.



**Gráfico 1:** Expressão do TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-10 (em número de vezes) das adolescentes do gênero feminino “metabolicamente obesas de peso normal” (G2) e com sobrepeso (G3), em relação ao grupo controle.

\*As medianas de expressão de cada grupo estão representadas por uma linha contínua. O nível de rejeição da hipótese de nulidade foi  $<0,05$  (Mann-Whitney).

**Tabela 4:** Correlação da expressão de citocinas e dos fatores relacionados à Síndrome Metabólica em adolescentes do gênero feminino com sobrepeso e nas “metabolicamente obesas de peso normal” (n = 48).

	<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	<b>IL-6</b>	<b>IL-10</b>	<b>Glicemia</b>	<b>Insulinemia</b>	<b>HOMA</b>	<b>CC</b>	<b>TG</b>	<b>HDL</b>	<b>PAS</b>	<b>PAD</b>
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	1,000	<b>0,355(*)</b>	<b>0,548(**)</b>	-0,197	0,018	-0,059	0,156	0,264	0,064	-0,47	0,170
<b>IL-6</b>	-	1,000	<b>0,340(*)</b>	0,025	-0,025	-0,025	-0,148	0,241	-0,108	-0,102	0,100
<b>IL-10</b>	-	-	1,000	-0,060	0,075	0,029	0,243	0,248	-0,256	-0,029	0,200

(Coeficiente de Correlação de Spearman)

\*\* p < 0,01

\* p < 0,05

**Tabela 5:** Correlação da expressão de citocinas e dos fatores relacionados à Síndrome Metabólica em adolescentes do gênero feminino “metabolicamente obesas de peso normal” (n = 24).

	<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	<b>IL-6</b>	<b>IL-10</b>	<b>Glicemia</b>	<b>Insulinemia</b>	<b>HOMA</b>	<b>CC</b>	<b>TG</b>	<b>HDL</b>	<b>PAS</b>	<b>PAD</b>
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	1,000	<b>0,463(*)</b>	<b>0,675(**)</b>	0,065	0,144	0,092	0,271	0,328	0,046	-0,342	0,021
<b>IL-6</b>	-	1,000	<b>0,584(**)</b>	<b>0,503(*)</b>	0,331	0,390	0,426	0,177	-0,175	-0,217	0,262
<b>IL-10</b>	-	-	1,000	0,392	-0,088	-0,056	0,246	0,054	-0,106	-0,318	0,263

(Coeficiente de Correlação de Spearman)

\*\* p < 0,01

\* p < 0,05

**Tabela 6:** Correlação da expressão de citocinas e dos fatores relacionados à Síndrome Metabólica em adolescentes do gênero feminino com sobrepeso (n = 24).

	<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	<b>IL-6</b>	<b>IL-10</b>	<b>Glicemia</b>	<b>Insulinemia</b>	<b>HOMA</b>	<b>CC</b>	<b>TG</b>	<b>HDL</b>	<b>PAS</b>	<b>PAD</b>
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	1,000	0,230	0,390	-0,269	-0,103	-0,181	-0,014	0,202	0,273	0,104	0,287
<b>IL-6</b>	-	1,000	0,418	-0,312	-0,186	-0,224	0,442	<b>0,463(*)</b>	-0,281	-0,063	0,65
<b>IL-10</b>	-	-	1,000	-0,322	0,049	-0,020	-0,005	0,431	-0,310	0,142	0,297

(Coeficiente de Correlação de Spearman)

\*\* p < 0,01

\* p < 0,05

## Referências Bibliográficas

Aygun AD, Gungor S, Ustundag B, Gurgoze MK, Sen Y. Proinflammatory cytokines and leptin are increased in serum of prepubertal obese children. *Mediators Inflamm* 2005, 2005(3):180-183.

Berg AH, Lin Y, Lisanti MP, Scherer PE. Adipocyte differentiation induces dynamic changes in NF- $\kappa$ B expression and activity. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2004, 287(6):E1178-88.

Bulló M, García-Lorda P, Peinado-Onsurbe J, Hernández M, Del Castillo D, Argilés JM, Salas-Salvadó J. TNF $\alpha$  expression of subcutaneous adipose tissue in obese and morbid obese females: relationship to adipocyte LPL activity and leptin synthesis. *Int J Obes* 2002; 26(5):652-8.

Daniels SR, Arnett DK, Eckel RH, Gidding SS, Hayman LL, Kumanyika S, Robinson TN, Scott BJ, Jeor SS, Williams CL. Overweight in children and adolescents. Pathophysiology, consequences, prevention, and treatment. *Circulation* 2005, 111(15):1999 – 2012.

De Lorenzo A, Del Gobbo V, Premrov MG, Bigioni M, Galvano F, Di Renzo L. Normal-weight obese syndrome: early inflammation? *Am J Clin Nutr* 2007, 85(1):40-5.

De Lorenzo A, Martinoli R, Vaia F, Di Renzo L. Normal weight obese (NWO) women: An evaluation of a candidate new syndrome. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2006, 16(8):513-23.

Esposito K, Pontillo A, Giuliano F, Giuliano G, Marfella R, Nicoletti G, Giuliano D. Association of low interleukin-10 levels with the metabolic syndrome in obese women. *J Clin Endocrinol Metab* 2003, 88(3):1055-8.

Exel EV, Gusseklo J, Craen AJ, Frölich M, Bootsma-Van Der Wiel A, Westerdorp RG. Low production capacity of interleukin-10 associates with the metabolic syndrome and type 2 diabetes: the Leiden 85-Plus Study. *Diabetes* 2002, 51(4):1088-92.

Fantuzzi G. Adipose tissue, adipokines, and inflammation. *J Allergy Clin Immunol* 2005, 115(5):911-9.

Ferranti SD, Gauvreau K, Ludwig DS, Newburger JW, Rifai N. Inflammation and changes in metabolic syndrome in US adolescents: findings from the 1988-1994 and 1999-2000 National Health and Nutrition Surveys. *Clin Chem* 2006, 52(7):1325-30.

Geloneze B, Tambascia MA. Avaliação laboratorial e diagnóstico da resistência insulínica. *Arq Bras Endocrinol Metab* 2006, 50(2):208-15.

Ghanim H, Aljada A, Hofmeyer D, Syed T, Mohanty P, Dandona P. Circulating mononuclear cells in the obese are in a proinflammatory state. *Circulation* 2004, 110(12):1564-71.

- Gilardini L, McTernan PG, Girola A, Silva NF, Alberti L, Kumar S, Invitti C. Adiponectin is a candidate marker of metabolic syndrome in obese children and adolescents. *Atherosclerosis* 2006, 189(2):401-7.
- Hermsdorff HHM, Monteiro JBR. Gordura Visceral, Subcutânea ou Intramuscular: Onde Está o Problema? *Arq Bras Endocrinol Metab* 2004, 48(6):803-11.
- I Diretriz Brasileira de Diagnóstico e Tratamento da Síndrome Metabólica. *Arq Bras Cardiol* 2005, 84 (supl. 1).
- Jelliffe DB. Evaluacion del estado de nutrición de la comunidad. Ginebra, Organización Mundial de la Salud, 1968 (Serie de monografias, 53).
- Juge-Aubry CE, Henrichot E, Meier CA. Adipose Tissue: a regulator of inflammation. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2005, 19(4):547-66.
- Kapiotis S, Holzer G, Schaller G, Haumer M, Widhalm H, Weghuber D, Jilma B, Röggl G, Wolzt M, Widhalm K, Wagner OF. A proinflammatory state is detectable in obese children and is accompanied by functional and morphological vascular changes. *Arterioscler Tromb Vasc Biol* 2006, 26(11):2541-6.
- Kern PA, Ranganathan S, Li C, Wood L, Ranganathan G. Adipose tissue tumor necrosis factor and interleukin-6 expression in human obesity and insulin resistance. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2001, 280(5):E745-51.
- Kuczmarski RJ, Ogden CL, Grummer-Strawn LM, Flegal KM, Guo SS, Wei R. CDC growth charts: United States. *Adv Data* 2000, 8(314):1-27.
- Lohman TG. Assessing fat distribution. In: *Advances in body composition assessment: current issues in exercise science*. Illinois, Human Kinetics. Champaign 1992, 57-63.
- Manigrasso MR, Ferroni P, Santilli F, Taraborelli T, Guagnano MT, Michetti N, Davì G. Association between circulating adiponectin and interleukin-10 levels in android obesity: effects of weight loss. *J Clin Endocrinol Metab* 2005, 90(10):5876-9.
- Mello VDF, Kolehmainen M, Schwab U, Mager U, Laaksonen DE, Pulkkinen L, Niskanen L, Gylling H, Atalay M, Rauramaa R, Uusitupa M. Effect of weight loss on cytokine messenger RNA expression in peripheral blood mononuclear cells of obese subjects with the metabolic syndrome. *Metabolism* 2008, 57(2):192-9.
- NCEP. Executive summary of the third report of National Cholesterol Education Program (NCEP) expert panel on detection, evaluation, and treatment of high blood cholesterol in adults (Adult Treatment Panel III). *JAMA* 2001, 285(19):2486-97.
- Paolisso G, Rizzo MR, Mazziotti G, Tagliamonte MR, Gambardella A, Rotondi M, Carella C, Giugliano D, Varricchio M, D'Onofrio AF. Advancing age and insulin resistance: role of plasma tumor necrosis factor- $\alpha$ . *Am J Physiol* 1998, 275(2 Pt 1):E294-9.

Pearson TA, Mensah GA, Alexander RW, Anderson JL, Cannon RO, Criqui M, Fadl YY, Fortmann SP, Hong Y, Myers GL, Rifai N, Smith SC, Taubert K, Tracy RP, Vinicor F. Markers of inflammation and cardiovascular disease: application to clinical and public health practice: a statement for Healthcare Professionals From the Centers for Disease Control and Prevention and the American Heart Association. *Circulation* 2003, 107(3):499-511.

Richards C, Gauldie J, Baumann H. Cytokine control of acute phase protein expression. *Eur Cytokine Netw* 1991, 2(2):89-98.

Ronti T, Lupattelli G, Mannarino E. The endocrine function of adipose tissue: an update. *Clin Endocrinol* 2006, 64(4):355-65.

Ruderman NB, Schneider SH, Berchtold P. The "metabolically-obese," normal-weight individual. *Am J Clin Nutr* 1981, 34(8):1617-1621.

Singh U, Devaraj S, Dasu MR, Ciobanu D, Reusch J, Jialal I. C-Reactive Protein Decreases Interleukin-10 Secretion in Activated Human Monocyte-Derived Macrophages via Inhibition of Cyclic AMP Production. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006, 26(11):2469-75.

Sociedade Brasileira de Cardiologia. V Diretrizes Brasileiras de Hipertensão Arterial, 2006. Disponível em: <http://publicacoes.cardiol.br/consenso/> [acesso em: 01/08/2007]

Sookoian S, García SI, Gianotti TF, Dieuzeide G, González CD, Pirola CJ. The G-308A promoter variant of the tumor necrosis factor- $\alpha$  gene is associated with hypertension in adolescents harboring the metabolic syndrome. *Am J Hypertens* 2005, 18(10):1271-5.

Taylor EW, Jones IE, Williams SM, Goulding A. Body fat percentages measured by dual-energy X-ray absorptiometry corresponding to recently recommended body mass index cutoffs for overweight and obesity in children and adolescents aged 3-18y. *Am J Clin Nutr* 2002, 76(6):1416-21.

Taylor EW, Jones IE, Williams SM, Goulding A. Evaluation of waist circumference, waist-to-rip ratio, and the conicity index as screening tools for high trunk fat mass, as measured by dual-energy X-ray absorptiometry, in children aged 3-19y. *Am J Clin Nutr* 2000, 72(2):490-5.

Vikram NK, Misra A, Pandey RM, Dwivedi M, Luthra K, Dhingra V, Talwar KK. Association between subclinical inflammation & fasting insulin in urban young adult north Indian males. *Indian J Med Res* 2006, 124(6):677-82.

Vitalle MSS, Tomioka CY, Juliano Y, Amancio OMS. Índice de massa corporal, desenvolvimento puberal e sua relação com a menarca. *Rev Ass Bras Med* 2003, 49(4):429-33.

## **5.2 ARTIGO 2: Expressão periférica de TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-10 em adolescentes do gênero feminino com sobrepeso resistentes à insulina.**

Carvalho, G.Q.; Pereira, P.F; Serrano, H.M.S; Franceschini, S.C.C.; De Paula, S.O.; Priore, S.E; Peluzio, M.C.G.

### **RESUMO**

**Objetivos:** Avaliar a expressão periférica do TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-10 em adolescentes do gênero feminino com sobrepeso e resistentes à insulina, bem como verificar a relação entre marcadores inflamatórios e os parâmetros relacionados com a síndrome metabólica. **Metodologia:** Avaliou-se 20 adolescentes do gênero feminino com sobrepeso, pós-púberes, de 14 a 17 anos, as quais foram divididas em 2 grupos: sem resistência insulínica (Si), com resistência insulínica (Ri). Coletaram-se dados relacionados aos parâmetros da síndrome metabólica: circunferência da cintura, glicemia de jejum, insulinemia de jejum, resistência insulínica, triglicérides, HDL, pressão arterial sistólica e diastólica. Avaliou-se a expressão do TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-10, e a correlação destas citocinas com os parâmetros da síndrome metabólica no Grupo Ri. **Resultados:** Não houve diferença na expressão das citocinas avaliadas entre os grupos Si e Ri, embora a expressão periférica de IL-10 no grupo Ri tenha apresentado-se 370% maior, em relação ao grupo Si. Nas adolescentes do grupo Si, a IL-6 correlacionou-se positivamente com a IL-10, e negativamente com a insulinemia. A IL-10 correlacionou-se negativamente com a glicemia de jejum no grupo Si. No grupo Ri, não houve correlação entre a expressão de citocinas e os parâmetros relacionados com a síndrome metabólica. **Conclusão:** Adolescentes com excesso de peso que possuem resistência insulínica apresentaram expressão periférica dos marcadores inflamatórios semelhante àquelas com excesso de peso sem resistência insulínica. O aumento da IL-10, e sua correlação negativa com a glicemia de jejum, indica possível papel protetor desta citocina no desenvolvimento de fatores de risco cardiovasculares.

**Palavras-chave:** Inflamação subclínica, TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-10, resistência insulínica, síndrome metabólica, adolescentes.

**ARTICLE 2: Peripheral expression of TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-10 in female overweight adolescents with insulin resistance.**

Carvalho, G.Q.; Pereira, P.F; Serrano, H.M.S; Franceschini, S.C.C.; De Paula, S.O.; Priore, S.E; Peluzio, M.C.G.

**ABSTRACT**

**Objectives:** To evaluate the peripheral expression of TNF- $\alpha$ , IL-6 and IL-10 in female overweight adolescents with insulin resistance and to verify the relationship between peripheral expression of inflammatory markers and the parameters related to metabolic syndrome. **Methodology:** Twenty female adolescents in post-pubescent were evaluated, 14 to 17 years old. They were divided into 2 groups: without insulin resistance (Si), with insulin resistance (Ri). Data related to the metabolic syndrome parameters were collected: waist circumference, fasting plasma glucose, fasting insulin, insulin resistance, triglycerides, HDL, systolic and diastolic blood pressure. It was evaluated the expression of TNF- $\alpha$ , IL-6 and IL-10, and the correlation of these cytokines with the parameters of the metabolic syndrome in Ri group. **Results:** There was no difference in the expression of cytokines evaluated among Si and Ri groups, although peripheric expression of IL-10 in the Ri group was 370% larger, regarding the Si group. In the adolescents of the Si group, IL-6 was positively correlated with IL-10, and negatively with insulinemia. IL-10 was negatively correlated with fast glicemia in the Si group. In the Ri group, there was no correlation between expression of cytokines and the parameters related with the metabolic syndrome. **Conclusion:** Overweight adolescents with insulin resistance had similar peripehric expression to those overweight adolescents without insulin resistance. The increase of IL-10, and their negative correlation with fast glicêmica, can indicate possible protective paper of this cytokine in the development of cardiovascular risk factors.

**Palavras-chave:** Subclinical inflammation, TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-10, insulin resistance, metabolic syndrome, adolescents.

### 5.2.1 Introdução

A síndrome metabólica corresponde a uma série de alterações hemodinâmicas e metabólicas, freqüentemente presentes no indivíduo obeso. Segundo a *Organização Mundial de Saúde* (OMS), a síndrome metabólica caracteriza-se por alteração no metabolismo da glicose (redução da tolerância à glicose/diabetes “mellitus”) e/ou resistência insulínica, além de dois ou mais dos seguintes fatores: hipertensão arterial sistêmica, obesidade de distribuição central, Índice de Massa Corporal (IMC) elevado, microalbuminúria, valores reduzidos de HDL-colesterol e hipertrigliceridemia (I Diretriz Brasileira de Diagnóstico e Tratamento da Síndrome Metabólica, 2005). No entanto, os parâmetros diagnósticos mais utilizados na prática clínica para a síndrome metabólica foram relatados em 2001 pelo *National Cholesterol Education Program – Adult Pannel III – NCEP/ATPIII* (NCEP, 2001). Segundo este critério, a síndrome metabólica está presente quando três ou mais das seguintes alterações são encontradas: hiperglicemia de jejum, circunferência da cintura elevada, hipertensão arterial sistêmica, hipertrigliceridemia e redução do HDL (Santos et al., 2006). A presença de síndrome metabólica pode aumentar em duas a três vezes o risco de morbidade cardiovascular, quando comparado com indivíduos sem a síndrome (Filho et al., 2006).

Não há consenso sobre a definição de síndrome metabólica em crianças e adolescentes. Brandão et al. (2005) relataram a possibilidade de utilização de parâmetros semelhantes aos utilizados pelo NCEP-ATPIII para diagnóstico da síndrome metabólica nestes indivíduos. De acordo com Gilardini et al. (2006), utilizando os parâmetros recomendados pelo NCEP-ATPIII, a síndrome metabólica acomete cerca de um quarto das crianças e adolescentes obesos.

A aparente associação entre obesidade e síndrome metabólica se deve à correlação entre obesidade e resistência insulínica, e ao fato de a resistência insulínica ser o fator fisiopatológico mais importante no desenvolvimento das alterações da síndrome metabólica (Valle et al., 2002). Com a resistência insulínica, as células beta do pâncreas aumentam a produção e secreção de insulina como medida compensatória, determinando no indivíduo um quadro de hiperinsulinemia. É este aumento no nível de insulina circulante, decorrente da resistência à insulina, o principal fator responsável pelas alterações encontradas na síndrome metabólica, como a hipertensão arterial, alterações no perfil lipídico, diabetes mellitus tipo 2 (Santos et al., 2006). Há evidências que demonstram que o aumento do nível de

insulina precede o desenvolvimento de um potencial fator de risco para a aterogênese, incluindo baixa concentração de HDL-colesterol, trigliceridemia, e hipertensão arterial (Reaven, 2004).

A resistência insulínica pode ser decorrente de diversos fatores, sendo bastante correlacionada ao sedentarismo, genética e obesidade, principalmente a obesidade abdominal (Santos et al., 2006). Entretanto, a obesidade por si só parece não explicar claramente o desenvolvimento deste distúrbio (Sinaiko et al., 2005).

A secreção de substâncias inflamatórias pelos adipócitos, mesmo em pequenas quantidades, contribui para indução da inflamação e ativação da resposta imune. Esses sinais inflamatórios emitidos pelo tecido adiposo, em indivíduos obesos, podem ter efeitos locais e sistêmicos na promoção da aterosclerose e resistência insulínica (Berg et al., 2004). O aumento de marcadores pró-inflamatórios tem se associado com a diminuição da sensibilidade insulínica, e parece ser o elo entre a obesidade e a resistência insulínica (Shoelson et al., 2006). Algumas citocinas pró - inflamatórias favorecem o estado de resistência insulínica, agindo diretamente nos receptores de insulina, e propiciando o desenvolvimento da síndrome metabólica nestes indivíduos (Juge–Aubry et al., 2005). Indivíduos com síndrome metabólica apresentam elevados níveis de citocinas e moléculas de adesão, indicando a presença de inflamação subclínica e, possivelmente, de disfunção endotelial nesta população (Festa et al., 2000; Salmenniemi et al., 2004). IL-6 e TNF- $\alpha$  são citocinas importantes, pois participam da indução e manutenção do estado pró-inflamatório subclínico associado com a obesidade (Shoelson et al., 2006).

Estudos populacionais avaliando a associação entre inflamação subclínica e resistência insulínica são escassos, principalmente com a população jovem. Estima-se que quanto mais cedo a presença de inflamação subclínica, maiores os efeitos deletérios a longo prazo, e maior o risco de desenvolvimento de resistência insulínica e síndrome metabólica.

Este estudo teve por objetivo avaliar a expressão periférica de TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-10, bem como a relação entre marcadores inflamatórios e os parâmetros relacionados com a síndrome metabólica em adolescentes do gênero feminino com sobrepeso e que apresentavam resistência insulínica.

## 5.2.2 Metodologia

### 5.2.2.1 Casuística

Tratou-se de estudo epidemiológico, transversal, controlado. A população avaliada constituiu-se de 20 adolescentes do gênero feminino com sobrepeso e idade entre 14 e 17 anos, estudantes de escolas públicas de Viçosa – MG. Avaliou-se o perfil de inflamação de adolescentes com sobrepeso, subdivididas em 2 grupos:

- Controle (Si): adolescentes que apresentavam sobrepeso, sem resistência insulínica (n = 10).
- Resistentes à insulina (Ri): adolescentes que apresentavam sobrepeso e resistência à insulina (n = 10).

Utilizou-se como critério de exclusão a utilização de medicamentos ou a presença de doenças que interferiam na expressão de marcadores inflamatórios, na pressão arterial, no perfil lipídico e/ou metabolismo glicídico, e aquelas em período gestacional. Também foram excluídas adolescentes com valores de Proteína C Reativa >10 mg/L, sendo este valor caracterizado como presença de possível processo inflamatório ou infecção, o que poderia afetar os resultados referentes à expressão de marcadores inflamatórios (Pearson et al., 2003). Assim, procurou-se garantir a homogeneidade da amostra, bem como diminuir as interferências na avaliação bioquímica, clínica e de composição corporal.

As adolescentes selecionadas apresentaram menarca há pelo menos 1 ano. A escolha de meninas que já tenham apresentado a menarca deve-se ao fato do estágio de maturação sexual estar relacionado com a composição corporal, e a presença da menarca caracteriza o estágio maturacional próximo do final (Vitalle et al., 2003).

A inclusão das adolescentes ocorreu após consentimento por escrito dos pais ou responsáveis, mediante assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido. O estudo foi desenvolvido após aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Federal de Viçosa (UFV).

### 5.2.2.2 Métodos

As avaliações antropométrica, de composição corporal e pressão arterial foram realizadas por único avaliador, capacitado para tal, no Ambulatório do Programa de Atenção à Saúde do Adolescente (PROASA) da UFV. As coletas sanguíneas foram realizadas por profissional capacitado no Laboratório de Análises Clínicas da Divisão de Saúde da UFV.

### Medidas Antropométricas e Composição Corporal

O peso e a estatura foram aferidos segundo recomendações de Jelliffe (1968), e utilizados para obtenção do Índice de Massa Corporal (IMC), calculado pela relação entre peso corporal total, em quilogramas, e estatura, em metros ao quadrado ( $\text{kg}/\text{m}^2$ ). Utilizou-se os pontos de corte e a referência antropométrica preconizados pelo *Center for Disease Control and Prevention – National Center for Health Statistics – CDC/NCHS* de 2000, segundo percentis para gênero e idade, considerando-se com sobrepeso aquelas que possuíam valores de IMC superiores ao percentil 85 (P85) das curvas do CDC de 2000 (Kuczmarski et al., 2000).

A circunferência da cintura (CC) foi aferida durante expiração normal, em duplicata, no ponto médio entre o último arco costal e a crista ilíaca, correspondendo à menor circunferência abaixo das costelas e acima do umbigo (Taylor et al., 2000).

A composição corporal foi estimada utilizando-se o aparelho de bioimpedância elétrica horizontal (Biodynamics©, modelo 310, versão 7.1). Esta avaliação foi realizada no mesmo dia em que ocorreu a coleta sanguínea para avaliação dos dados bioquímicos, sendo precedida de 12 horas de jejum. As adolescentes foram orientadas a seguir procedimentos prévios, a fim de não comprometer os resultados: estar há pelo menos 7 dias da data da última menstruação e 7 antes da próxima; não fazer uso de diuréticos pelo menos nos 7 dias anteriores à realização do exame; não realizar exercício físico nas 12 horas anteriores à realização do exame e urinar 30 minutos antes da realização do exame, com a bexiga vazia.

### Pressão Arterial Sistêmica

Para avaliação da pressão arterial, utilizou-se o monitor de pressão sanguínea de inflação automática. A técnica para aferição da pressão arterial seguiu as normas da Sociedade Brasileira de Cardiologia (2006) e do manual do aparelho de pressão arterial automático.

Foram realizadas pelo menos três medidas, com intervalo de um minuto entre elas, sendo a média das duas últimas considerada a pressão arterial do indivíduo. Caso as pressões diastólicas obtidas apresentassem diferenças superiores a 4mmHg, novas verificações foram realizadas, até que se obtivessem medidas com diferença inferior a esse valor. As medições foram obtidas no membro superior esquerdo.

### Avaliação bioquímica

Os parâmetros bioquímicos analisados foram: glicemia de jejum, insulinemia de jejum, HDL e triglicérides. As amostras foram colhidas por punção venosa, após 12 horas de jejum, com material descartável, sendo utilizado o analisador automático de parâmetros bioquímicos COBAS<sup>®</sup>. As análises foram realizadas no Laboratório de Análises Clínicas da Divisão de Saúde da Universidade Federal de Viçosa/UFV, no município de Viçosa/MG. Os níveis de insulina foram dosados em um laboratório de referência da cidade do Rio de Janeiro, RJ.

A resistência insulínica foi avaliada por meio do modelo matemático HOMA-IR (*Homeostasis Model Assessment - Insulin Resistance*), baseado na medida da glicemia e insulina de jejum (Geloneze & Tambascia, 2006):

$$\text{HOMA-IR} = \text{glicemia (mMol)} \times \text{insulina (uUmL)} \div 22,5$$

O ponto de corte utilizado para adolescentes foi de 3,16 conforme preconizado na I Diretriz de Prevenção da Aterosclerose na Infância e na Adolescência (2005). Valores de HOMA  $\geq$  3,16 caracterizavam adolescentes com resistência insulínica, enquanto que valores inferiores caracterizavam adolescentes sensíveis à insulina.

### Marcadores de risco para a Síndrome Metabólica

Em virtude da ausência de consenso acerca dos parâmetros e pontos de corte a serem utilizados no diagnóstico da síndrome metabólica em adolescentes, foram utilizados os parâmetros recomendados pelo National Cholesterol Education Program/Adult Treatment Panel III (NCEP/ATPIII) em 2001 para adultos (NCEP, 2001). Tal escolha baseou-se na maior utilização desta referência na população adulta, bem como na relativa facilidade de obtenção dos parâmetros preconizados.

Segue os parâmetros propostos para diagnóstico clínico da Síndrome Metabólica pelo NCEP/ATP III (NCEP, 2001):

- Glicemia de jejum
- Circunferência da cintura (CC)
- Triglicérides (TG)
- HDL (*high density lipoprotein*)
- Pressão Arterial (sistólica e diastólica – PAS e PAD)

Apesar de não incluídas no critério proposto pelo NCEP (2001), a insulinemia de jejum e a resistência insulínica também foram consideradas fatores de risco para síndrome metabólica, tendo em vista que a resistência insulínica/hiperinsulinemia é

considerada o principal fator fisiopatológico da síndrome metabólica (I Diretriz Brasileira de Diagnóstico e Tratamento da Síndrome Metabólica, 2005).

#### Quantificação do mRNA dos marcadores inflamatórios

A quantificação do mRNA dos marcadores inflamatórios foi feita por meio da técnica quantitativa “Real-Time Polymerase Chain Reaction” (RT-PCR). Para tanto, foi coletado o “buffy coat” (concentrado de leucócitos) do sangue das adolescentes, após centrifugação do sangue venoso a 2.260g por 10 minutos em tubo contendo anticoagulante (tubo vacutainer® com EDTA). Após coleta, o buffy coat foi congelado imediatamente em nitrogênio líquido, e conservado a -80°C até o momento das análises.

##### ✓ Extração do RNA

O mRNA total da amostra do *buffy coat* foi extraído utilizando o reagente Trizol (Invitrogen). Em um *eppendorf* de 2mL, foram adicionados 1mL de Trizol, incubando por 5 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, foram adicionados 150µL de clorofórmio, agitando manualmente por 15 segundos e incubando à temperatura ambiente por 2 minutos. Após centrifugação (12.000g por 15 minutos à 4°C), a fase aquosa foi transferida para um novo *eppendorf* de 2mL, no qual foram adicionados 380µL de isopropanol. A amostra foi incubada por 10 minutos à temperatura ambiente, e então centrifugada a 12.000g por 10 minutos a 4°C. Após este processo, o sobrenadante foi cuidadosamente desprezado, e o precipitado foi lavado com 750µL de etanol gelado (75%), mantendo esta solução estocada a -70°C *overnight*. Após este período, a amostra foi centrifugada (7500g por 10 minutos à 20°C), desprezando-se cuidadosamente o sobrenadante e secando o precipitado em estufa (37°C). Na última fase, a amostra foi ressuspensa em 40µL de água deionizada autoclavada e incubada por 10 minutos a 35°C, a fim de facilitar a solubilização do mRNA extraído.

##### ✓ Reações de real time RT-PCR

O DNA complementar foi confeccionado utilizando 11µL de mRNA extraído, por meio de reação utilizando a enzima transcriptase reversa (Fermentas). A análise quantitativa do mRNA foi realizada pela técnica de PCR em tempo real no equipamento 7300 Real-Time PCR System - Applied Biosystems, utilizando o sistema de quantificação por fluorescência SYBR-Green (Platinum® SYBR® Green qPCR SuperMix with ROX - Invitrogen). O ciclo da RT-PCR envolveu uma desnaturação inicial de 95°C (10 minutos) e então 40 ciclos, com 1 minuto de

denaturação (94°C), 1 minuto de anelamento (56°C) e 2 minutos de alongamento (72°C), seguidos da curva padrão de dissociação.

Utilizou-se os “primers” (“sense” e “antisense”) dos mediadores: TNF- $\alpha$ s 5' AAGCCTGTAGCCCATGTTGT 3' e TNF- $\alpha$ as 5' CAGATAGATGGGCTCAT-ACC 3', IL-6s 5' AAGCCAGAGCTGTGCAGATGA 3' e IL-6as 5' TTTGCCGAA -GAGCCCTCA 3', IL-10s 5' AGATCTCCGAGATGCCTTCA 3' e IL-10as 5' CCG-TGGAGCAGGTGAAGAAT 3', e B-actins 5' ATGTTTGAGACCTTCAACA 3' e B-actinas 5' CACGTCAGACTTCATGATGG 3'. As condições de PCR foram otimizadas considerando a concentração do primer, ausência de formação de dímeros, eficiência na amplificação dos genes alvo e controle dos genes constituintes.

Para cada reação foram utilizados 20 $\mu$ L de *primers* (400nM), 5 $\mu$ L de cDNA e 25 $\mu$ L de SBYR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems). Os limites de detecção para o resultado positivo da PCR foram baseados nas concentrações ao início do estudo. Cálculos para determinação do nível relativo da expressão do gene foram feitos de acordo com instruções do fabricante - User's Bulletin from Applied Biosystems - tendo como referência a  $\beta$ -actina da amostra, usando o método *cycle threshold* (Ct). O Ct é ponto onde um aumento exponencial significativo na quantidade de amplificado (fluorescência) é primeiramente detectado (geralmente 10 vezes o valor inicial). As médias dos valores das duplicatas do Ct das adolescentes com sobrepeso resistentes à insulina foram utilizadas para calcular a expressão do gene de interesse de cada indivíduo do grupo, com a normalização de um controle interno ( $\beta$  - actina). Esse valor foi então comparado com a expressão do gene de indivíduos controle para cálculo do aumento da expressão do gene, utilizando a fórmula do  $2^{-\Delta Ct}$ , também de acordo com o fabricante.

### 5.2.2.3 *Análise estatística*

A análise dos dados foi realizada utilizando o software *Sigma Statistic® for Windows*, versão 2.0, sendo utilizado o teste não paramétrico Mann-Whitney para grupos independentes, e o coeficiente de correlação de Spearman para avaliação da correlação entre variáveis não paramétricas. O nível de rejeição da hipótese de nulidade foi < 0,05 ou 5%.

Para confecção dos gráficos, foi utilizado o software *GraphPad Prism® 1999*, versão 3.0.

### 5.2.3 Resultados

A mediana (mínimo – máximo) das características gerais da amostra está demonstrada na **Tabela 1**. Não houve diferença nas variáveis peso, IMC e gordura corporal das adolescentes de ambos os grupos, o que sugere a homogeneidade da amostra em relação à composição corporal. Apesar da distinção em relação à sensibilidade à insulina, as adolescentes de ambos os grupos apresentavam excesso de gordura corporal.

No que diz respeito às variáveis relacionadas à síndrome metabólica, pode-se verificar que aquelas resistentes à insulina apresentavam maiores valores de circunferência da cintura, pressão arterial sistólica, insulinemia e do índice HOMA-IR (**Tabela 2**). Os outros parâmetros não diferiram entre os grupos avaliados.

Quando avaliado o perfil inflamatório das adolescentes, observou-se que não houve diferença na expressão das citocinas avaliadas entre os grupos (**gráfico 1**), embora a expressão periférica de IL-10 no grupo Ri tenha apresentado-se 370% maior, em relação ao grupo Si (**Tabela 3**).

Ao se avaliar a correlação entre a expressão de citocinas e os parâmetros relacionados com a síndrome metabólica nas adolescentes de ambos os grupos, verificou-se correlação positiva apenas entre IL-6 e IL-10 (**Tabela 4**). Nas adolescentes do grupo Si, a IL-6 também correlacionou-se positivamente com a IL-10, e negativamente com a insulinemia. A IL-10, ainda, correlacionou-se negativamente com a glicemia de jejum no grupo Si (**Tabela 5**). Não houve correlação entre a expressão de citocinas e os parâmetros relacionados com a síndrome metabólica nas adolescentes do grupo Ri (**Tabela 6**).

### 5.2.4 Discussão

No presente estudo, verificou-se que ambos os grupos avaliados não diferiram em relação às características antropométricas e de composição corporal. No entanto, no que diz respeito às características relacionadas com a síndrome metabólica, percebeu-se que aquelas com sobrepeso resistentes à insulina possuíam maiores valores de circunferência da cintura, pressão arterial sistólica, insulinemia e do índice HOMA-IR. Isto indica que a presença de resistência insulínica pode ser

um fator de risco para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares em indivíduos obesos, mesmo em adolescentes.

Em virtude da importância do papel fisiopatológico da resistência insulínica no desenvolvimento de síndrome metabólica, esta condição tem sido cada vez mais estudada. Adolescentes obesos apresentam maiores prevalências de alterações metabólicas, como dislipidemias, hipertensão arterial, diabetes *mellitus* tipo 2 / hiperglicemia, hiperinsulinemia / resistência insulínica (Valle et al., 2002). Existe relação direta entre a prevalência de obesidade e síndrome metabólica na adolescência, sugerindo que esta síndrome também possa apresentar comportamento ascendente nos dias atuais (Brandão et al., 2005).

Segundo Lee et al. (2006), utilizando dados de adolescentes de 12 a 19 anos participantes do National Health and Nutrition Examination Survey 1999-2002, a prevalência de resistência insulínica em adolescentes obesos foi de 52,1%. A resistência insulínica é um das primeiras desordens detectadas, e precede o aparecimento dos demais componentes da síndrome metabólica. A hiperinsulinemia é considerada um fator comum no desenvolvimento das desordens metabólicas e, dessa forma, um fator de risco independente para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares na vida adulta (Steiberger et al., 2003; Sookoian et al., 2005).

O maior valor de circunferência da cintura verificado nas adolescentes com resistência insulínica pode ser indicativo da participação do tecido adiposo visceral no desenvolvimento deste distúrbio. Adolescentes com intolerância à glicose possuem maior quantidade de tecido adiposo visceral e menor quantidade de tecido adiposo subcutâneo (Rodríguez et al., 2004). A distribuição da adiposidade parece ser o fator de risco mais importante no desenvolvimento da resistência insulínica, e conseqüentemente, da síndrome metabólica, do que a quantidade de gordura corporal total (Oliveira et al., 2004; Pitanga e Lessa, 2006).

A importância do estudo da inflamação subclínica em adolescentes se baseia no fato de que sua presença em indivíduos jovens pode aumentar o risco de morbidade nesta população, bem como a cronicidade dos distúrbios presentes na vida adulta. Isto sugere possível efeito deletério da inflamação subclínica em longo prazo.

Estudos demonstrando associação entre inflamação crônica subclínica e resistência insulínica em adolescentes com excesso de peso são relativamente escassos. Em sua maioria, os estudos são conduzidos com adultos, e poucos deles garantem a homogeneidade da amostra. Segundo Chávez et al. (2006), existe correlação positiva entre resistência insulínica e marcadores inflamatórios,

independente da idade, gênero, e outros fatores de risco para a resistência insulínica, como a obesidade, a inatividade física, tabagismo e consumo de álcool. Entretanto, quando tais fatores não são controlados, pode haver confusão na interpretação dos resultados.

No presente estudo avaliou-se a expressão periférica de citocinas utilizando as células que constituem o *buffy coat*. O *buffy coat* corresponde a um concentrado leucocitário, de aparência esbranquiçada, obtido após centrifugação do sangue total em tubo contendo anticoagulante. Os estudos conduzidos até então com indivíduos obesos demonstraram o aumento da expressão e da secreção de citocinas pelo tecido adiposo, bem como o aumento da concentração plasmática destas citocinas (Wang et al., 2005; De Lorenzo et al., 2007). Pouco se sabe sobre a participação das células mononucleares periféricas na produção de citocinas pró-inflamatórias, e conseqüente indução de processo inflamatório subclínico em obesos. Sugere-se que as citocinas pró-inflamatórias estimulam a ativação periférica de células mononucleares do sistema imunológico, os quais aumentam a secreção de citocinas, ampliando assim o processo inflamatório subclínico visto em indivíduos obesos (Fantuzzi, 2005). Estima-se que a obesidade e a resistência insulínica em humanos sejam associadas à ativação de células inflamatórias mononucleares e ao aumento da expressão de citocinas, embora estas células não sejam a fonte primária para elevação das citocinas pró-inflamatórias em indivíduos obesos (Mello et al., 2008).

A utilização de células sanguíneas parece conveniente no estudo da expressão gênica, uma vez que tal amostra pode ser facilmente coletada em suficientes quantidades e utilizando-se de métodos menos invasivos, em contraste com outros tecidos, como o adiposo, muscular e hepático. Além disso, seus resultados são mais reprodutíveis e são sensíveis em relação à presença de inflamação subclínica na população estudada (Mello et al., 2008).

No presente estudo verificou-se que, nas adolescentes com sobrepeso resistentes à insulina, a expressão periférica de TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-10 era semelhante àquelas sem resistência insulínica, embora a IL-10 nas adolescentes do grupo Ri tenham apresentado um aumento na expressão de 370% em relação ao grupo Si.

Estes resultados não descartam a possível presença de inflamação subclínica nas adolescentes com resistência insulínica, e nem a participação das citocinas pró-inflamatórias na redução da sensibilidade insulínica nestas adolescentes. Isto porque foi avaliada apenas a participação das células periféricas na expressão de TNF- $\alpha$ , IL-

6 e IL-10, não sendo avaliada a participação do tecido adiposo na expressão destes mediadores, e nem o teor das citocinas na circulação sanguínea.

O aumento de 370% na expressão da IL-10, apesar de não diferir estatisticamente em relação à expressão do grupo Si, pode ser clinicamente importante. As citocinas são produzidas na presença de algum estímulo, sendo bioativas em concentrações muito baixas. A ocupação de 10% de seu receptor é suficiente para desencadear uma resposta (Juge-Aubry et al., 2005). Considerando que a IL-10 é uma citocina com ação antiinflamatória, estes resultados podem representar uma tentativa do organismo em cessar um possível processo inflamatório vigente. Resultados semelhantes foram descritos por Esposito et al. (2003), os quais afirmaram que, apesar de sua maior expressão em indivíduos obesos, a ação antiinflamatória da IL-10 parece não ser eficaz, tendo em vista que, sua produção é insuficiente para se obter o efeito protetor. Além disso, esta citocina não é capaz de cessar o processo inflamatório, o qual possui um mecanismo eficiente de retroalimentação.

A correlação positiva entre a expressão periférica de IL-6 e IL10, nas adolescentes do grupo Si e nos dois grupos juntos (Si + Ri), reforça a hipótese de que a expressão de IL-10 aumentaria em virtude do aumento da expressão de IL-6, na tentativa de regular o processo inflamatório.

Quando avaliada a relação entre a expressão periférica das citocinas e os parâmetros relacionados com a síndrome metabólica, observou-se correlação negativa entre a expressão periférica da IL-6 e insulinemia de jejum. Este resultado difere da maioria dos estudos, que sugerem que as citocinas pró-inflamatórias agem favorecendo o desenvolvimento de resistência insulínica e a hiperglicemia (Hak et al., 2001; Moon et al., 2004; Pickup, 2004).

Moon et al. (2004) demonstraram relação entre inflamação subclínica e os componentes da síndrome metabólica em adolescentes (obesos e não obesos juntos). O TNF- $\alpha$  sérico se correlacionou positivamente com os níveis de triglicerídeos e a pressão arterial diastólica. No grupo de adolescentes obesos, o TNF- $\alpha$  sérico se correlacionou com triglicerídeos e a pressão arterial diastólica, não sendo encontrada correlação entre esta citocina e colesterol total, HDL, glicemia de jejum e pressão arterial diastólica. Segundo Hak et al. (2001), a inflamação subclínica e a ativação de células endoteliais são componentes da síndrome metabólica. Sendo assim, além do controle e perda de peso, o tratamento deste distúrbio pode requerer estratégias antiinflamatórias (Hak et al., 2001; Salmenniemi et al., 2004).

Segundo Pickup (2004), a inflamação subclínica predispõe o desenvolvimento de resistência insulínica, e este por sua vez aumenta a inflamação encontrada em indivíduos obesos, sugerindo um estado de retroalimentação do processo inflamatório. Isto porque a insulina é um hormônio relacionado com a inibição da síntese de proteínas de fase aguda. Em modelos animais de diabetes, a resposta inflamatória de fase aguda é aumentada na deficiência de insulina.

A correlação negativa entre IL-10 e glicemia de jejum confirmam o efeito protetor desta citocina. Estudos demonstram correlação negativa entre esta citocina e os parâmetros relacionados com a síndrome metabólica, exceto o HDL, o qual se correlaciona positivamente (Manigrasso et al., 2005; Exel et al., 2002). O estudo de Exel et al. (2002) demonstrou que a elevada expressão de IL-10 no sangue periférico poderia ser um fator protetor ao desenvolvimento de diabetes mellitus tipo 2.

O conhecimento da dinâmica da inflamação subclínica em indivíduos com excesso de peso se configura como importante campo a ser estudado, necessitando-se de maior aprofundamento. De modo geral, o que se evidencia é a escassez de estudos que relacionem a contribuição das células periféricas do sistema imunológico no desenvolvimento de inflamação subclínica e resistência insulínica. Crianças e adolescentes são populações pouco estudadas, apesar da importância clínica da presença de tais distúrbios em indivíduos jovens. Deve-se avaliar o efeito em longo prazo da inflamação crônica subclínica, a fim de se conhecer o impacto da presença precoce desta condição. Sugere-se a realização de estudos longitudinais com indivíduos jovens para avaliações neste sentido.

### **5.2.5 Conclusão**

Neste estudo, as adolescentes com sobrepeso resistentes à insulina possuíam maiores valores de circunferência da cintura, pressão arterial sistólica, insulinemia e do índice HOMA-IR, em detrimento daquelas sem resistência insulínica. A expressão periférica do TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-10 foi semelhante nas adolescentes com sobrepeso resistentes à insulina e naquelas sem resistência insulínica, embora a expressão periférica de IL-10 no grupo Ri tenha apresentado-se 370% maior, em relação ao grupo Si. A correlação negativa entre IL-10 e IL-6 sugere a inter-relação entre os processos pró e antiinflamatórios, como uma tentativa do organismo de regular o processo inflamatório.

Em relação aos componentes da síndrome metabólica, ao contrário do relatado pela literatura, a IL-6 correlacionou-se negativamente com a insulinemia de jejum. A IL-10 correlacionou-se negativamente com a glicemia de jejum, reforçando o papel protetor desta citocina no desenvolvimento de fatores de risco cardiovasculares.

## 5.2.6 Tabelas e gráficos

**Tabela 1:** Características antropométricas de adolescentes do gênero feminino, estudantes de escolas públicas de Viçosa-MG.

	Sensíveis à insulina (Si) n = 10	Resistentes à insulina (Ri) n = 10	Valor de p
<b>Idade (anos)</b>	15 (14 - 17)	15,5 (14 - 17)	<b>0,705</b>
<b>Peso (kg)</b>	66,4 (57,4 - 90,0)	73,45 (59,3 - 116,0)	<b>0,212</b>
<b>Estatura (cm)</b>	160,9 (148,6 - 165,9)	159,4 (152,9 - 167,3)	<b>0,791</b>
<b>IMC (kg/m<sup>2</sup>)</b>	26,1 (24,15 - 33,58)	28,78 (23,45 - 41,4)	<b>0,385</b>
<b>GC (%)</b>	30,95 (29,2 - 39,6)	34,4 (29,8 - 42,40)	<b>0,089</b>

Considerando  $p < 0,05$  (Mann-Whitney).

**Tabela 2:** Parâmetros relacionados à Síndrome Metabólica, em adolescentes do gênero feminino, estudantes de escolas públicas de Viçosa-MG.

	Sensíveis à insulina (Si) n = 10	Resistentes à insulina (Ri) n = 10	Valor de p
<b>Glicemia (mg/dL)</b>	78,5 (65,0 - 89,0)	85,0 (71,0 - 92,0)	<b>0,104</b>
<b>Insulinemia (mg/dL)</b>	11,0 (6,3 - 13,3)	23,65 (16,2 - 39,8)	<b>&lt;0,001</b>
<b>HOMA -IR</b>	1,921 (1,212 - 2,855)	4,87 (3,197 - 8,549)	<b>&lt;0,001</b>
<b>Circunferência da cintura (cm)</b>	74,55 (67,70 - 91,6)	84,2 (74,45 - 105,2)	<b>0,014</b>
<b>Triglicerídeos (mg/dL)</b>	69,5 (44,0 - 104,0)	87,5 (60,0 - 114,0)	<b>0,082</b>
<b>HDL (mg/dL)</b>	46,0 (33,0 - 52,00)	36,5 (34,0 - 55,0)	<b>0,226</b>
<b>Pressão Sistólica (mmHg)</b>	100,0 (94,0 - 130,0)	109,5 (101,0 - 131,0)	<b>0,034</b>
<b>Pressão Diastólica (mmHg)</b>	70,00 (60,0 - 88,0)	73,5 (63,0 - 95,0)	<b>0,199</b>

Considerando  $p < 0,05$  (Mann-Whitney).

**Tabela 3:** Expressão das citocinas\* (número de vezes em relação ao grupo eutrófico) de adolescentes do gênero feminino com sobrepeso e resistência insulínica (Ri) e naquelas com sobrepeso sem resistência insulínica (Si), estudantes de escolas públicas de Viçosa-MG.

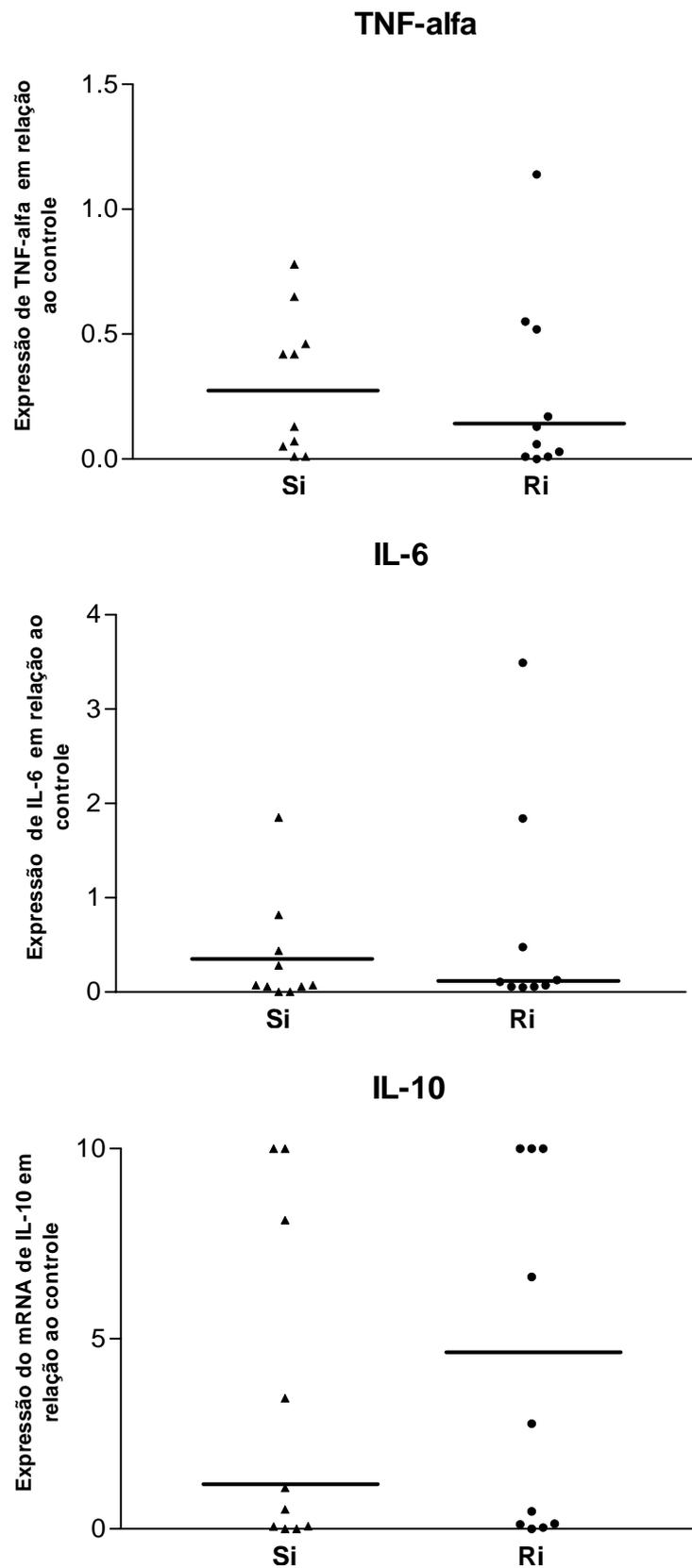
	<b>Si</b>	<b>Ri</b>	<b>Valor de P</b>
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	0,272 (0,01 – 0,78)	0,15 (0,01 – 4,62)	0,791
<b>IL-6</b>	0,36 (0,06 – 9,23)	0,11 (0,05 – 3,49)	0,391
<b>IL-10</b>	1,22 (0,06 - 88,82)	4,70 (0,04 – 60,86)	0,910

\* Mediana (mínimo – máximo)

Considerando  $p < 0,05$  (Mann-Whitney).

Resultado de 1,22 significa um aumento na expressão de 22% em relação ao grupo Si.

Resultado de 4,70 significa um aumento na expressão de 370% em relação ao grupo Si.



**Gráfico 1:** Expressão do TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-10 (em número de vezes) das adolescentes do gênero feminino com sobrepeso sem resistência insulínica (Si) e com sobrepeso resistentes à insulina (G3), em relação ao grupo controle.

\*Expressão do mRNA acima de 10x foram representados como 10.

\*\*As medianas de expressão de cada grupo estão representadas por uma linha contínua. O nível de rejeição da hipótese de nulidade foi  $<0,05$  (Mann-Whitney).

**Tabela 4:** Correlação da expressão de citocinas e dos fatores relacionados à Síndrome Metabólica em adolescentes do gênero feminino com sobrepeso (n = 20).

	<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	<b>IL-6</b>	<b>IL-10</b>	<b>Glicemia</b>	<b>Insulinemia</b>	<b>HOMA</b>	<b>CC</b>	<b>TG</b>	<b>HDL</b>	<b>PAS</b>	<b>PAD</b>
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	1,000	0,194	0,407	-0,244	-0,194	-0,215	0,109	0,185	0,288	0,241	0,347
<b>IL-6</b>	-	1,000	<b>0,594(**)</b>	-0,131	-0,047	-0,033	-0,177	0,403	-0,255	0,139	0,126
<b>IL-10</b>	-	-	1,000	-0,259	0,071	-0,060	-0,133	0,344	-0,354	-0,044	0,140

(Coeficiente de Correlação de Spearman)

\*\* p < 0,01

\* p < 0,05

**Tabela 5:** Correlação da expressão de citocinas e dos fatores relacionados à Síndrome Metabólica em adolescentes do gênero feminino com sobrepeso sensíveis à insulina (n = 10).

	<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	<b>IL-6</b>	<b>IL-10</b>	<b>Glicemia</b>	<b>Insulinemia</b>	<b>HOMA</b>	<b>CC</b>	<b>TG</b>	<b>HDL</b>	<b>PAS</b>	<b>PAD</b>
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	1,000	0,176	0,442	-0,372	-0,164	-0,200	-0,091	0,273	0,263	0,365	0,438
<b>IL-6</b>	-	1,000	<b>0,745(*)</b>	-0,463	<b>-0,648(*)</b>	-0,491	-0,600	0,321	-0,092	-0,097	0,036
<b>IL-10</b>	-	-	1,000	<b>-0,652(*)</b>	-0,576	-0,467	-0,612	0,321	-0,226	-0,134	-0,043

(Coeficiente de Correlação de Spearman)

\*\* p < 0,01

\* p < 0,05

**Tabela 6:** Correlação da expressão de citocinas e dos fatores relacionados à Síndrome Metabólica em adolescentes do gênero feminino com sobrepeso resistentes à insulina (n = 10).

	<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	<b>IL-6</b>	<b>IL-10</b>	<b>Glicemia</b>	<b>Insulinemia</b>	<b>HOMA</b>	<b>CC</b>	<b>TG</b>	<b>HDL</b>	<b>PAS</b>	<b>PAD</b>
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	1,000	0,283	0,297	-0,067	-0,140	-0,176	0,394	0,406	0,122	0,176	0,321
<b>IL-6</b>	-	1,000	0,367	0,293	0,176	0,117	0,217	0,317	-0,252	0,583	0,167
<b>IL-10</b>	-	-	1,000	0,116	0,140	0,091	0,394	0,224	-0,610	0,030	0,273

(Coeficiente de Correlação de Spearman)

\*\* p < 0,01

\* p < 0,05

## Referências Bibliográficas

Berg AH, Lin Y, Lisanti MP, Scherer PE. Adipocyte differentiation induces dynamic changes in NF- $\kappa$ B expression and activity. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2004, 287(6):E1178-88.

Brandão AA, Magalhães MEC, França MF, Pozzan R, Brandão AP. Síndrome metabólica em crianças e adolescentes. *Rev Bras Hipertens* 2005, 12(3):169-77.

Chávez AG, Hernandez LMM, Zúñiga MJS, Argueta SE, Zarza JEN, Rodríguez ZSR. Inflamación y resistencia a la insulina: Mecanismos para el desarrollo de la disfunción endotelial y aterosclerosis. *Rev Mex Cardiol* 2006, 17(2):71-82.

De Lorenzo A, Del Gobbo V, Premrov MG, Bigioni M, Galvano F, Di Renzo L. Normal-weight obese syndrome: early inflammation? *Am J Clin Nutr* 2007, 85(1):40-5.

Esposito K, Pontillo A, Giuliano F, Giuliano G, Marfella R, Nicoletti G, Giuliano D. Association of low interleukin-10 levels with the metabolic syndrome in obese women. *J Clin Endocrinol Metab* 2003, 88(3):1055-8.

Exel EV, Gusseklo J, Craen AJ, Frölich M, Bootsma-Van Der Wiel A, Westerdorp RG. Low production capacity of interleukin-10 associates with the metabolic syndrome and type 2 diabetes: the Leiden 85-Plus Study. *Diabetes* 2002, 51(4):1088-92.

Fantuzzi G. Adipose tissue, adipokines, and inflammation. *J Allergy Clin Immunol* 2005, 115(5):911-9.

Festa A, D'Agostino RJr, Howard G, Mykkänen L, Tracy RP, Haffner SM. Chronic subclinical inflammation as part of the insulin resistance syndrome as part of the Insulin Resistance Atherosclerosis Study (IRAS). *Circulation* 2000, 102(1):42-7.

Geloneze B, Tambascia MA. Avaliação laboratorial e diagnóstico da resistência insulínica. *Arq Bras Endocrinol Metab* 2006, 50(2):208-15.

Gilardini L, McTernan PG, Girola A, Silva NF, Alberti L, Kumar S, Invitti C. Adiponectin is a candidate marker of metabolic syndrome in obese children and adolescents. *Atherosclerosis* 2006, 189(2):401-7.

Hak AE, Pols HAP, Stehouwer CDA, Meijer J, Kiliaan AJ, Hofman A, Breteler MMB, Witteman JCM. Markers of inflammation and cellular adhesion molecules in relation to insulin resistance in nondiabetic elderly: The Rotterdam Study. *J Clin Endocrinol Metab* 2001, 86(9):4398-405.

I Diretriz Brasileira de Diagnóstico e Tratamento da Síndrome Metabólica. *Arq Bras Cardiol* 2005, 84 (supl. 1).

I Diretriz de Prevenção da Aterosclerose na Infância e na Adolescência. *Arq Bras Cardiol* 2005, 85 (supl. 6).

- Jelliffe DB. Evaluacion del estado de nutrición de la comunidad. Ginebra, Organización Mundial de la Salud, 1968 (Serie de monografías, 53).
- Juge-Aubry CE, Henrichot E, Meier CA. Adipose Tissue: a regulator of inflammation. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2005, 19(4):547-66.
- Kuczmarski RJ, Ogden CL, Grummer-Strawn LM, Flegal KM, GAO SS, Weir R. CDC growth charts: United States. *Adv Data* 2000, 8(314):1-27.
- Lee JM, Okumura MJ, Davis MM, Herman WH, Gurney JG. Prevalence and determinants of insulin resistance among U.S. adolescents. A population-based study. *Diabetes Care* 2006, 29(11):2427-32.
- Manigrasso MR, Ferroni P, Santilli F, Taraborelli T, Guagnano MT, Michetti N, Davi G. Association between circulating adiponectin and interleukin-10 levels in android obesity: effects of weight loss. *J Clin Endocrinol Metab* 2005, 90(10):5876-9.
- Mello VDF, Kolehmainen M, Schwab U, Mager U, Laaksonen DE, Pulkkinen L, Niskanen L, Gylling H, Atalay M, Rauramaa R, Uusitupa M. Effect of weight loss on cytokine messenger RNA expression in peripheral blood mononuclear cells of obese subjects with the metabolic syndrome. *Metabolism* 2008, 57(2):192-9.
- Moon Y-S, Kim D-H, Song D-K. Serum Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  levels and components of the metabolic syndrome in obese adolescents. *Metabolism* 2004, 53(7):863-7.
- NCEP. Executive summary of the third report of National Cholesterol Education Program (NCEP) expert panel on detection, evaluation, and treatment of high blood cholesterol in adults (Adult Treatment Panel III). *JAMA* 2001, 285(19):2486-97.
- Oliveira CL, Mello MT, Cintra IP, Fisberg M. Obesidade e síndrome metabólica na infância. *Rev Nutr* 2004, 17(2):237-45.
- Pearson TA, Mensah GA, Alexander RW, Anderson JL, Cannon RO, Criqui M, Fadl YY, Fortmann SP, Hong Y, Myers GL, Rifai N, Smith SC, Taubert K, Tracy RP, Vinicor F. Markers of inflammation and cardiovascular disease: application to clinical and public health practice: a statement for Healthcare Professionals From the Centers for Disease Control and Prevention and the American Heart Association. *Circulation* 2003, 107(3):499-511.
- Pickup JC. Inflammation and activated innate immunity in the pathogenesis of type 2 diabetes. *Diabetes Care* 2004, 27(3):813-23.
- Pitanga FJG, Lessa I. Razão cintura-estatura como discriminador do risco coronariano de adultos. *Rev Assoc Med Bras* 2006, 52(3):157-61.
- Reaven GM. Insulin resistance, cardiovascular disease, and the metabolic syndrome. How well do the emperor's clothes fit? *Diabetes Care* 2004, 27(4):1011-2.

- Rodríguez G, Moreno LA, Blay MG, Blay VA, Garagorri JM, Sarria A, Buen M. Body composition in adolescents: measurements and metabolic aspects. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2004, 28(Suppl 3):S54-8.
- Salmenniemi U, Ruotsalainen E, Pihlajamäki J, Vaukonen I, Kainulainen S, Punnonen K, Vanninen E, Laakso M. Multiple abnormalities in glucose and energy metabolism and coordinated changes in levels of adiponectin, cytokines, and adhesion molecules in subjects with metabolic syndrome. *Circulation* 2004, 110(25):3842-8.
- Santos CRB, Portella ES, Ávila SS, Soares EA. Fatores dietéticos na prevenção e tratamento de comorbidades associadas à síndrome metabólica. *Rev Nutr* 2006, 19(3):389-401.
- Shoelson SE, Lee J, Goldfine AB. Inflammation and insulin resistance. *J Clin Invest* 2006, 116(7):1793-801.
- Sinaiko AR, Steinberger J, Moran A, Prineas RJ, Vessby B, Basu S, Tracy R, Jacobs DR. Relation of body mass index and insulin resistance to cardiovascular risk factors, inflammatory factors, and oxidative stress during adolescence. *Circulation* 2005, 111(15):1985-91.
- Sociedade Brasileira de Cardiologia. V Diretrizes Brasileiras de Hipertensão Arterial. Disponível em: <http://publicacoes.cardiol.br/consenso/> [acesso em: 01/08/2007]
- Sookoian S, García SI, Gianotti TF, Dieuzeide G, González CD, Pirola CJ. The G-308A promoter variant of the tumor necrosis factor- $\alpha$  gene is associated with hypertension in adolescents harboring the metabolic syndrome. *Am J Hypertens* 2005, 18(10):1271-5.
- Steinberger J, Steffen L, Jacobs JR, DR, Moran A, Hong CP, Sinaiko AR. Relation of leptin to insulin resistance syndrome in children. *Obesity Research* 2003, 11(9):1124-30.
- Taylor EW, Jones IE, Williams SM, Goulding A. Evaluation of waist circumference, waist-to-rip ratio, and the conicity index as screening tools for high trunk fat mass, as measured by dual-energy X-ray absorptiometry, in children aged 3-19y. *Am J Clin Nutr* 2000, 72(2):490-5.
- Valle M, Gascón F, Martos R, Ruz FJ, Bermudo F, Morales R, Cañete R. Metabolic Cardiovascular Syndrome in obese prepurbertal children: The role of high fasting insulin levels. *Metabolism* 2002, 51(4):423-8.
- Vitalle MSS, Tomioka CY, Juliano Y, Amancio OMS. Índice de massa corporal, desenvolvimento puberal e sua relação com a menarca. *Rev Ass Bras Med* 2003, 49(4):429-33.
- Wang B, Jenkins JR, Trayhurn P. Expression and secretion of inflammation-related adipokines by human adipocytes differentiated in culture: integrated response to TNF $\alpha$ . *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2004; 288(4):E731-40.

## 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A utilização do “buffy coat” (concentrado de leucócitos) nas análises de expressão gênica permitiu o conhecimento da participação das células periféricas do sistema imunológico na expressão de citocinas relacionadas com o perfil inflamação subclínica encontrado em indivíduos do gênero feminino com excesso de gordura corporal.

O aumento da expressão periférica de citocinas foi verificado nas adolescentes com excesso de gordura, independente do excesso de peso corporal. Adolescentes “metabolicamente obesas de peso normal” apresentaram perfil metabólico, inflamatório e de composição corporal semelhante às adolescentes com sobrepeso (com excesso de peso e gordura corporal). Pode-se, assim, afirmar que o risco de desenvolvimento de doenças crônicas não-transmissíveis está associado ao excesso de gordura corporal, mesmo em indivíduos jovens.

Embora poucos parâmetros da síndrome metabólica tenham se relacionado com a expressão de citocinas, verificou-se correlação positiva entre IL-6 e glicemia nas adolescentes “metabolicamente obesas de peso normal”, e entre IL-6 e triglicérides nas adolescentes com sobrepeso. Sugere-se que a inflamação subclínica possa constituir importante componente encontrado em adolescentes com excesso de gordura corporal, influenciando a fisiopatologia e tratamento da síndrome metabólica. Talvez, o maior tempo de exposição à inflamação subclínica possa significar maiores alterações metabólicas, o que não foi possível avaliar neste trabalho por se tratar de um estudo transversal.

A maior expressão de IL-10 nas adolescentes com sobrepeso, em relação às eutróficas, e nas com sobrepeso resistentes à insulina, em relação às sem resistência insulínica, se configura como importante resultado encontrado neste estudo. O aumento da expressão de citocinas antiinflamatórias traduz a complexidade da resposta inflamatória. Provavelmente, este fato se deve à tentativa do organismo em cessar a produção de citocinas pró-inflamatórias, promovendo assim a homeostasia. Como a expressão das citocinas pró-inflamatórias permanece aumentada, sugere-se que a ação da IL-10 não seja suficiente para sobrepor a ação do TNF- $\alpha$  e da IL-6.

O conhecimento da dinâmica do processo de inflamação subclínica em indivíduos jovens com excesso de gordura corporal propicia a compreensão da participação do tecido adiposo no desenvolvimento de doenças crônicas não-

transmissíveis nesta população em especial. Não se conhece, no entanto, o efeito em longo prazo da presença de inflamação subclínica na prevalência e cronicidade dos distúrbios metabólicos. Também faz-se necessário conhecer a dinâmica do processo inflamatório em adolescentes do gênero masculino com excesso de gordura corporal, a fim de se verificar possíveis diferenças relacionadas ao gênero.

## ANEXO I

**ANEXO II**  
**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE ESCLARECIDO**

Estou ciente de que:

1. Os procedimentos que serão adotados na pesquisa **“Inflamação crônica subclínica e resistência insulínica: imunomodulação em adolescentes com sobrepeso e metabolicamente obesas de peso normal”** são resumidos em: aplicação de questionários para obtenção de dados pessoais e de saúde, avaliação antropométrica por métodos não invasivos (peso, altura, circunferência da cintura, avaliação da composição corporal por impedância elétrica horizontal e bipedal), aferição da pressão arterial, realização de exames laboratoriais para análise do colesterol total e frações, triglicerídeos, glicemia, insulina de jejum, e marcadores inflamatórios.
2. Não serei submetido a nenhum tipo de intervenção que possa causar danos à minha saúde.
3. A minha participação é voluntária. Tenho o direito de abandonar o estudo a qualquer momento sem justificativa.
4. Os dados obtidos estarão disponíveis para a equipe envolvida na pesquisa e poderão ser publicados com a finalidade de divulgação das informações científicas obtidas, não sendo divulgada a identidade dos voluntários.
5. Eu não receberei remuneração por minha participação nesse projeto.
6. Se houver descumprimento de qualquer norma ética poderei recorrer ao Comitê de Ética na Pesquisa com Seres Humanos da UFV, dirigindo-me ao seu Presidente: Gilberto Paixão Rosado, pelo telefone: 3899-1269.

De posse de todas as informações necessárias, concordo em participar do projeto.

Voluntário : \_\_\_\_\_

Data: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

**Em caso de dúvidas, entrar em contato:**

Gisele Queiroz Carvalho - Nutricionista (CRN 2006100192)

Telefone: 3892-5494

**ANEXO III**  
**UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE**  
**DEPARTAMENTO DE NUTRIÇÃO E SAÚDE**

Nome \_\_\_\_\_ Data: \_\_\_\_\_  
 Nome do responsável \_\_\_\_\_  
 Data de Nascimento \_\_\_\_\_  
 Idade: \_\_\_\_\_  
 Telefone: \_\_\_\_\_  
 Escola: \_\_\_\_\_  
 Grupo: ( ) controle ( ) sobrepeso ( ) metabolicamente obesa de peso normal  
 Data da menarca \_\_\_\_\_ Data da última menstruação \_\_\_\_\_  
 Possui alguma doença? ( ) Não ( ) Sim \_\_\_\_\_  
 Faz uso de algum medicamentos (incluindo anticoncepcional)? ( ) Sim ( ) Não  
 Quais? \_\_\_\_\_ Há quanto tempo? \_\_\_\_\_  
 Fuma? ( ) Sim ( ) Não  
 Ingere bebidas alcoólicas? \_\_\_\_\_  
 Com que frequência? \_\_\_\_\_

**Avaliação Antropométrica e Bioquímica**

Parâmetro/Índice	Valores
Peso (Kg)	
Estatura(cm)	
IMC (kg/m <sup>2</sup> )	
IMC/I (percentil)	
Gordura corporal (%)	
Circunferência da cintura (cm)	
Pressão arterial (mmHg)	
<b>Parâmetros bioquímicos</b>	
Glicemia de jejum (mg/dL)	
Insulinemia de jejum (mg/dL)	
Resistência insulínica (HOMA)	
HDL	
Triglicerídeos	